ISBN 978-987-688-124-1





Manual de microbiología general



María Reynoso, Carina Magnoli, Germán Barros y Mirta Demo



Manual de microbiología general /
María M. Reynoso ... [et.al.]. - 1a ed. - Río Cuarto : UniRío Editora, 2015.
E-Book. - (Pasatextos)

ISBN 978-987-688-124-1

1. Microbiología. 2. Agronomía. I. Reynoso, María M.
CDD 660.62

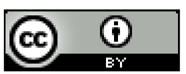
Fecha de catalogación: 26/05/2015

Manual de Microbiología General
María M. Reynoso, Carina E. Magnoli, Germán G. Barros y Mirta S. Demo.

Ruta Nacional 36 km 601 – (X5804) Río Cuarto – Argentina
Tel.: 54 (358) 467 6309 – Fax.: 54 (358) 468 0280
editorial@rec.unrc.edu.ar - www.unrc.edu.ar/unrc/comunicacion/editorial/

Primera edición: *Junio de 2015*

ISBN 978-987-688-124-1





Uni. Tres primeras letras de "Universidad". Uso popular muy nuestro; la Uni.
Universidad del latín "universitas" (personas dedicadas al ocio del saber),
se contextualiza para nosotros en nuestro anclaje territorial y en la concepción de
conocimientos y saberes construidos y compartidos socialmente.

El río. Celeste y Naranja. El agua y la arena de nuestro Río Cuarto
en constante confluencia y devenir.

La gota. El acento y el impacto visual: agua en un movimiento
de vuelo libre de un "nosotros".
Conocimiento que circula y calma la sed.

PRESENTACIÓN

La Microbiología, es una ciencia relativamente nueva con respecto a otras ramas de la Biología. Aunque se pueden encontrar raíces más profundas, la ciencia de la microbiología no se desarrolló realmente hasta el siglo XIX. El estudio de los microorganismos se inició a partir de que Antonie van Leewenhoek en 1670 diseñó el microscopio y observó por primera vez a las bacterias mientras analizaba infusiones de pimienta, y que a partir de los estudios de Luis Pasteur en 1876, se logró el mayor desarrollo y reconocimiento de los microorganismos como protagonistas de una gran diversidad de procesos.

Aunque durante mucho tiempo estos organismos causaron graves problemas de enfermedades en plantas, animales y humanos también es cierto que desde la antigüedad algunas especies microbianas han sido utilizadas en procesos de producción de alimentos fermentados como quesos, vino, pan y cerveza, entre otros y actualmente se ha reconocido su importancia en diversas áreas de investigación básica, en la industria alimentaria, ambiental y farmacéutica.

El objetivo general de la asignatura Microbiología I es que el estudiante se inicie en el conocimiento de la biología básica de los microorganismos (beneficiosas y perjudiciales), en sus características morfológicas, fisiológicas, nutricionales y genéticas, proporcionando un panorama global de la importancia de los mismos en la vida del hombre y en las modificaciones que ocurren en la naturaleza en base a sus actividades como saprófitos, parásitos o simbiontes. Asimismo, se pretende que el estudiante adquiera las habilidades necesarias para su manipulación en el laboratorio.

El manual está dividido en ocho capítulo, contiene 7 teóricos prácticos, 6 prácticas de laboratorios y una guía de preguntas teóricas, diseñados para que el estudiante se familiarice gradualmente con los contenidos de la asignatura. El orden de presentación, corresponde al programa de la asignatura Microbiología I (código 2159), que forma parte del plan de estudio de la carrera Microbiología impartida en la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Debido a que este manual está dirigido a estudiantes que iniciarán su experiencia en el manejo de los microorganismos, consideramos de gran importancia incluir al principio del mismo una serie de recomendaciones relacionadas con las reglas generales del laboratorio y los principales procedimientos que el estudiante deberá aprender, para que manipule en forma adecuada a los microorganismos y garantizar tanto su seguridad como la de sus compañeros.

En cada tema, se presentan los contenidos teóricos consultados a partir de una amplia bibliografía, cuyas citas se sugieren al final de cada uno. Los trabajos teóricos prácticos incluyen situaciones problemáticas, que el estudiante deberá resolver consultando el material bibliográfico sugerido u otro que considere apropiado. Las prácticas de laboratorio, contienen los objetivos, se indican los materiales necesarios y procedimientos a realizarse en forma de instrucciones numeradas que se complementan con figuras y esquemas. Posteriormente, en cada práctica se proponen formas de presentación de los resultados en cuadros, para que el estudiante recopile sus observaciones.

Consideramos que este manual puede ser de gran ayuda para los profesores y estudiantes en el curso de Microbiología I y otros que se imparten en la UNRC, está elaborado de acuerdo a la infraestructura de los laboratorios y a la programación de la asignatura, con sesiones de 10 horas por semana, incluyendo teóricos y prácticos.

ÍNDICE

CAPÍTULO VIII.
PREGUNTAS TEÓRICAS 93

CAPÍTULO I. NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

1. Introducción

El trabajo en el laboratorio de Microbiología debe ser considerado de alto riesgo para todo el personal de laboratorio debido al manejo de muestras potencialmente contaminadas con patógenos microbianos y de cultivos de microorganismos obtenidos a partir de dichas muestras. La exposición del personal de laboratorio a este riesgo debe ser minimizada y controlada mediante un plan de bioseguridad. Los riesgos biológicos infecciosos más comunes en el laboratorio de microbiología incluyen cultivos de microorganismos (bacterias, micobacterias, hongos, virus y parásitos) en altas concentraciones, muestras clínicas de origen humano o animal conteniendo agentes infecciosos y otros riesgos como toxinas, alergenos, productos recombinantes, etc.

Es importante considerar que existen cuatro elementos necesarios para que se inicie una infección: **un huésped susceptible, un agente infeccioso, la concentración de dicho agente infeccioso (dosis infectante) y una ruta de transmisión**. Esta última es la única que puede ser controlada por medio de normas de bioseguridad y por lo tanto es indispensable brindarle especial atención a las rutas más comunes de transmisión: oral, respiratoria, percutánea y contacto directo con la piel y/o las mucosas.

Toda muestra clínica, fluidos corporales, tejidos y cultivos microbianos, deben ser considerados como infecciosos para el personal de laboratorio y deben ser manipulados bajo determinadas medidas de contención, las cuales incluyen adecuadas prácticas microbiológicas, la utilización de barreras físicas, un adecuado diseño de laboratorio y cámaras de bioseguridad. El uso de vacunas seguras y eficaces (si están disponibles) puede proporcionar un mecanismo adicional para la reducción de las infecciones ocupacionales.

El establecimiento de los programas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología es responsabilidad de los administradores del mismo. Sin embargo, es importante tener claro que no es posible crear un ambiente de laboratorio saludable y seguro sin que cada una de las personas que trabajan en él no asuma su cuota de responsabilidad hacia la seguridad en el laboratorio.

2. Clasificación de los microorganismos por grupos de riesgo

El concepto de grupo de riesgo fue desarrollado como una manera de clasificar los diferentes tipos de microorganismos (bacterias, virus, hongos, parásitos) dependiendo del grado de virulencia para el ser humano, animales y plantas. Se han definido cuatro grupos de riesgo de microorganismos, cuyas características se indican a continuación:

Grupo de riesgo 1	•En este grupo se incluyen microorganismos que durante mucho tiempo han sido estudiados y/o cultivados bajo diversas circunstancias y se ha demostrado, con base al conocimiento científico actual, que no representan ningún riesgo para la salud humana y para su medio ambiente, aunque algunos de estos microorganismos podrían representar algún riesgo para niños o para adultos inmunosupresos. Ejemplo: *Bacillus subtilis*
Grupo de riesgo 2	•En este grupo se incluyen microorganismos de moderado riesgo potencial para el personal de laboratorio y que usualmente están asociados con enfermedad en seres humanos. Ejemplos: *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Haemophilus* spp., cepas patógenas de *Escherichia coli, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus.*
Grupo de riesgo 3	•En este grupo se incluyen microorganismos altamente infecciosos y que pueden causar graves enfermedades sistémicas en seres humanos. Ejemplos: *Mycobacterium tuberculosis*, todas las especies de *Brucella.*
Grupo de riesgo 4	•En este grupo se incluyen microorganismos exóticos, altamente infecciosos, causantes de enfermedades mortales en el ser humano para los cuales no existe un tratamiento efectivo. Ejemplo: virus Ebola, virus Hanta; virus Junín y Mapucho.

3. Cámaras de bioseguridad

Las cámaras de bioseguridad son utilizadas para reducir la contaminación y minimizar la exposición del personal de laboratorio a los agentes microbianos. Todos aquellos procedimientos que generen aerosoles o que involucren la manipulación de patógenos microbianos que puedan causar infección por inhalación deben ser llevados a cabo en cámaras de bioseguridad. Las cámaras de bioseguridad de clase II son recomendadas para laboratorios de niveles de bioseguridad 2 y 3. La protección del personal está dada por el movimiento del aire del cuarto hacia la abertura frontal de la cámara, de manera que la seguridad del personal estará comprometida si el flujo de aire es distorsionado por otras corrientes de aire en el laboratorio. Por tal motivo, las cámaras de bioseguridad deben ser colocadas en lugares distantes de las puertas, pasillos o sitios en el laboratorio donde exista mucha actividad.

Al igual que en otros procedimientos, el personal de laboratorio que use la cámara de bioseguridad debe ser apropiadamente entrenado. Se debe utilizar guardapolvos de manga larga y guantes (en el caso que sea necesario) para proteger las manos y los antebrazos de una posible contaminación. La superficie de trabajo debe ser descontaminada antes de introducir el material de trabajo. Todos los materiales y el equipo a utilizar deben estar colocados en su lugar antes de que se inicie el trabajo. En las cámaras de bioseguridad clase II no se debe colocar absolutamente nada sobre las rejillas de salida del flujo de aire.

La organización de la superficie de trabajo es importante. Los materiales contaminados deben ser separados de los materiales limpios y/o estériles de manera que los primeros no pasen sobre los segundos, se debe tomar en cuenta en todo momento en cuenta la técnica aséptica y el material contaminado se debe descartar desinfectado y tapado.

Las cámaras de bioseguridad clase II utilizan un flujo de aire no turbulento denominado flujo laminar que evita tanto el escape de material infeccioso de la cámara como el ingreso de este del cuarto hacia el interior de la misma.

La operación y el mantenimiento de las cámaras de bioseguridad clase II deben incluir el dejar funcionando el sistema de flujo laminar permanentemente, aun cuando no se esté utilizando la cámara, la aplicación de luz ultravioleta en el interior de la cámara, la desinfección rutinaria de la superficie de trabajo con desinfectantes apropiados y el cambio anual de los prefiltros del sistema.

4. Niveles de bioseguridad

Nivel de bioseguridad 1

En el nivel de bioseguridad 1 los microorganismos que pueden ser manipulados están bien definidos y caracterizados por tener una muy baja o ninguna virulencia para personas adultas saludables y pertenecen al grupo de riesgo 1. El acceso a este laboratorio debe ser limitado o restringido y las puertas y ventanas deben permanecer cerradas, el mobiliario debe ser fácil de lavar y desinfectar y tienen que estar disponibles lavamanos con jabón, desinfectante y toallas de papel. Todos los desechos generados que implican algún riesgo biológico deben ser autoclavados o incinerados.

Los procedimientos operativos deben estar incluidos en las guías de bioseguridad en el laboratorio, deben estar claramente detalladas por escrito y accesibles en todo momento para el personal de laboratorio. Se debe proporcionar un entrenamiento inicial en prácticas microbiológicas, en las guías de bioseguridad y en los procedimientos para el control de las infecciones a cada uno de los nuevos empleados, estudiantes y visitantes.

Nivel de bioseguridad 2

En laboratorios del nivel de bioseguridad 2 es donde se efectúa la mayor parte del trabajo rutinario del laboratorio de microbiología, incluyendo el manejo de muestras clínicas de diversa índole y la manipulación de cultivos de microorganismos.

En este laboratorio debe estar disponible un autoclave para esterilizar todos los desechos infecciosos. Los procedimientos que involucren la generación de aerosoles deben ser efectuados en una cámara de bioseguridad clase II. Se deben utilizar guantes, anteojos protectores y barbijos cuando se manipulan muestras clínicas, cultivos microbianos o material contaminado.

Se debe limitar al máximo el uso de agujas y jeringas y extremar los cuidados para minimizar el riesgo de una autoinoculación y de generación de aerosoles. Todos los derrames de material infecciosos y accidentes deben ser inmediatamente reportados al responsable del laboratorio.

El responsable del laboratorio, con el apoyo de los responsables de los diferentes laboratorios a su cargo, es el responsable directo de establecer y/o aprobar todas las políticas y los procedimientos para la operación segura del laboratorio.

Nivel de bioseguridad 3

Los microorganismos que deben ser trabajados en el nivel de bioseguridad 3 son altamente infecciosos, pueden causar graves infecciones sistémicas en seres humanos inmunocompetentes e incluyen a *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Coxiella burnetii* y todas las especies de *Brucella*.

Todas las actividades de laboratorio, incluyendo el manejo de muestras clínicas y de cultivos microbianos, deben ser realizadas en cámaras de bioseguridad clase II o utilizando combinaciones de protección personal y contención física. El laboratorio debe estar

físicamente separado de otras áreas abiertas al flujo de tráfico irrestricto dentro del edificio, y el acceso al laboratorio debe estar restringido. El laboratorio debe tener un lavamanos colocado cerca de la salida y debe tener un dispositivo que permita abrir el grifo del lavamanos con el pie, con el codo o automáticamente.

Las ventanas deben ser selladas y las puertas deben tener un dispositivo para que se cierren por sí mismas. Debe tener un sistema de ventilación diseñado de tal manera que sea unidireccional e ingrese al laboratorio por el área de entrada.

Nivel de bioseguridad 4

El nivel de bioseguridad 4 es el máximo nivel de contención física para el trabajo con microorganismos altamente infecciosos causantes de enfermedades exóticas, usualmente mortales, para las cuales no se tienen vacunas y tratamientos eficaces. Presenta únicamente agentes virales, como los virus Ebola y Hanta, pero no agentes bacterianos.

5. Manejo de los desechos infecciosos

Los residuos generados en los laboratorios microbiológicos y clínicos presentan riesgos y dificultades especiales en su manejo debido, fundamentalmente, al carácter infeccioso de algunos de sus constituyentes. La heterogeneidad de su composición contribuye a acrecentar los riesgos, especialmente en el caso de desechos del laboratorio bacteriológico, donde existen cultivos con bacterias patógenas, objetos punzocortantes como agujas de jeringas, trozos de vidrio o plástico, sangre humana y sus derivados, residuos de muestras para cultivo y otros.

Los desechos deben ser manejados en una forma racional, dependiendo del nivel de bioseguridad del laboratorio, el tipo de material que constituye el desecho, el tipo de tratamiento aplicado al desecho y la forma en que los desechos tratados son eliminados de la institución. Por convenio se utiliza el color amarillo para designar el desecho infeccioso del nivel de bioseguridad 2, mientras que el color rojo se usa para designar el desecho infeccioso del nivel de bioseguridad 3.

Se debe contar con contenedores o recipientes de tamaño, forma y material adecuados, con el fin de asegurar un fácil manejo y limpieza. Se considera óptimo el uso de recipientes de metal o plástico, de estructura rígida y con tapa. En esos recipientes se colocan bolsas plásticas capaces de soportar el proceso de autoclavado. Los desechos deben ser tratados tan pronto como sea posible y si es necesario almacenarlos se debe disponer de un área de almacenamiento para desechos infecciosos de acceso restringido.

La esterilización de los desechos infecciosos mediante el uso de vapor saturado (autoclavado) es el método más comúnmente utilizado. La velocidad de destrucción depende del tipo de estructura a destruir (célula vegetativa o espora), del tiempo, la temperatura y de la presencia de humedad. Las condiciones más recomendadas se obtienen con un tratamiento de los desechos a 121°C (1 atm) por un período de 20 a 30 minutos, dependiendo del volumen de los desechos infecciosos a esterilizar.

En el caso de desechos líquidos que han sido tratados se descartan directamente en los sistemas de desagüe a un tanque de depuración para seguir a los sistemas sanitarios convencionales. Los desechos sólidos procedentes de incineradores y autoclaves se deben descartar en basureros de metal o plástico rígido, provisto de tapa para su posterior transporte a rellenos sanitarios.

6. Recomendaciones para el estudiante

Reglas del laboratorio

– El acceso al laboratorio de prácticas sólo se permite a los estudiantes que estén realizando las prácticas. No se admiten visitas por razones de seguridad.

– Es obligatorio utilizar guardapolvos abrochados siempre que se esté trabajando en el laboratorio. Durante el periodo de prácticas, el guardapolvo no debe utilizarse fuera del laboratorio.

– Debe respetarse la prohibición de beber, comer, y/o almacenar cualquier tipo de alimento o bebida dentro del laboratorio.

– Debe respetarse la prohibición de fumar, aplicarse cosméticos o tocarse la cara con las manos o algún otro objeto. Se deberá lavarse meticulosamente las manos con jabón y agua antes de salir del laboratorio, incluso cuando salga por breves periodos.

Procedimientos de laboratorio

– Cada estudiante es responsable de la limpieza de su lugar de trabajo y del material asignado, así como de los equipos (microscopios, balanzas, etc.) que haya usado.

– En la superficie de trabajo no deben depositarse en ningún momento ropa u objetos personales.

– Se deben usar los mecheros Bunsen con precaución, no dejando material inflamable cerca y evitando el posible contacto con pelo y ropas. Se comprobará que se ha apagado el gas al finalizar el experimento y al abandonar el laboratorio.

– Está prohibido pipetear con la boca.

– Ante un vertido accidental de material microbiológico debe informarse inmediatamente al profesor encargado del grupo.

– La eliminación de residuos, material desechable y material reciclable se realizará siguiendo las pautas del punto 5, utilizando los contenedores dispuestos a tal efecto.

7. Bibliografía

Manual de bioseguridad en el laboratorio (2005). Organización Mundial de la Salud. 3a ed. Ginebra.

Normas generales para el manejo de laboratorios (FCEFQyN−UNRC). Disponible en: http://www.exa.unrc.edu.ar/webfce/documentos/seguridadyMedioAmbiente/2010/UNRC-FCEFQyN-PG-05%20Normas%20generales%20para%20el%20Trabajo%20en%20Laboratorios.pdf

TEÓRICO PRÁCTICO 1.
SEGURIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Ud. trabajará durante el desarrollo de los trabajos prácticos de la asignatura Microbiología I con cultivos puros de los siguientes microorganismos: *Escherichia coli, Staphylococcus aeurus, S. epidermidis*, *Pseudomonas aeuruginosa, P. fluorescens, Pseudomonas* sp.*, Lactobacillus* sp.*, Proteus* sp.*, Saccharomyces* sp.*, Alternaria* sp.*, Aspergillus* sección *Flavi, Aspergillus* sección *Nigri,* entre otros.

1) Indique a qué grupo de riesgo, según la Organización Mundial de la Salud, pertenecen dichos microorganismos. ¿Por qué?

2) ¿Qué tipo de laboratorio considera Ud. que se requiere para poder trabajar con los grupos a los que pertenecen dichos microorganismos? ¿Por qué?

3) ¿Cuáles son las vías de penetración de los microorganismos en el hombre y/o animal? ¿De qué modo puede adquirirse la infección en el laboratorio? Explique brevemente.

4) ¿Cuáles son las barreras que permiten prevenir las infecciones adquiridas en el laboratorio?

5) Desde su punto de vista, el laboratorio que utiliza para realizar las prácticas de la asignatura, ¿cumple con los requisitos para la realización de los mismos? ¿Por qué?

6) ¿Necesitaría otro tipo de laboratorio si debiera: a) Repicar una cepa de *Bacillus subtilis* para su conservación; b) realizar un ensayo de propagación del Virus HIV; c) determinar la presencia de *Clostridium botulinum* en conservas; d) fenotipificar una cepa de *E. coli* presuntamente enterohemolítica; e) determinar la presencia de *Salmonella* sp. en una muestra de mayonesa; f) determinar la presencia de *Candida albicans* en exudado vaginal; g) determinar la presencia de *Brucella abortus* en muestras de placenta de terneras presuntamente infectadas? ¿Por qué? En todos los casos fundamente su respuesta.

CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS DE MICROSCOPIA, MONTAJE Y COLORACIONES DE MUESTRAS

1. Introducción

Los microorganismos son demasiados pequeños para ser observados a simple vista, por lo cual debe utilizarse un microscopio. La palabra microscopio deriva del vocablo latino *micro*, que significa pequeño, y del vocablo griego *skopo*s, que significa observar. Para el examen microscópico de los microorganismos se puede utilizar el microscopio óptico o el microscopio electrónico.

2. MICROSCOPIO ÓPTICO (MO) O DE LUZ

El término microscopia óptica se refiere al empleo de cualquier clase de microscopio que utilice luz visible para observar las muestras. Según las propiedades luminosas del instrumento existen distintos tipos de microscopios ópticos: *de campo claro, contraste de fase, campo oscuro* y *fluorescencia.*

MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO

Un microscopio de campo claro tiene una serie de lentes y utiliza luz visible como fuente de iluminación (Figura 2.1). Un conjunto de lentes forma una imagen focal definida cuyo tamaño es muchas veces mayor que el de la muestra en sí. Este aumento se logra cuando los rayos luminosos procedentes de la **fuente de luz** pasan a través de un **condensador**, que tiene lentes que dirigen los rayos de luz a través de la muestra. Desde aquí los rayos pasan al interior del **objetivo**, la lente más próxima a la muestra. La imagen de la muestra vuelve a ser ampliada por el **ocular**.

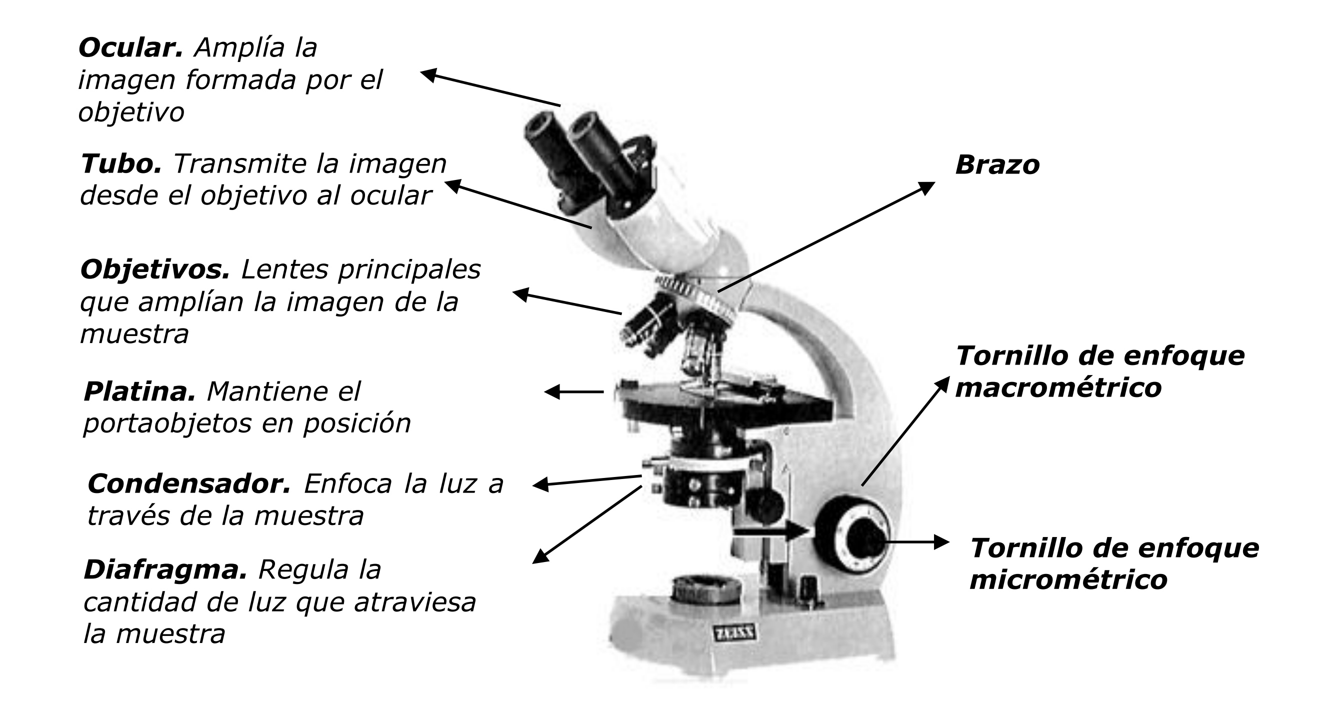


Figura 2.1. Microscopio óptico compuesto. Partes principales y funciones.

La **capacidad amplificadora** de un microscopio compuesto es el producto del aumento individual de los oculares y los lentes objetivos. La mayoría de los microscopios utilizados en microbiología poseen varias lentes objetivos, que proporcionan 10x (bajo aumento), 40x (gran aumento) y 100x (de inmersión en aceite). La mayoría de los oculares amplían la imagen 10 veces. Al multiplicar el aumento de un objetivo específico por el del ocular (10x) se observa que el aumento total puede ser de 100A con bajo aumento, de 400A con gran aumento y 1000A con lente de inmersión.

La **resolución** se define como el espacio de máxima aproximación entre dos puntos en el que aún se pueden observar claramente como dos entidades independientes. El poder de resolución de un microscopio está sujeto a la longitud de onda de la luz y a la propiedad de las lentes conocidas como la apertura numérica (AN). El límite del poder de resolución de un microscopio es aproximadamente igual a 0,61/AN que para un microscopio óptico es de alrededor de 200 nm.

A menor longitud de onda de la luz y AN de las lentes, el poder de resolución del microscopio será mejor. Por lo tanto, queda claro que el poder de resolución de los microscopios ópticos se encuentra restringido por la AN que se obtenga de los sistemas de lentes y las longitudes de onda del espectro de luz visible.

La **apertura numérica** indica la cantidad de luz que entra en un objetivo desde un punto del campo del microscopio. Tal valor es muy importante, ya que, de él depende el poder de resolución, la propiedad más importante de un objetivo.

La AN de una lente depende del índice de refracción (N) del medio que llena el espacio entre el objeto y la parte frontal del objetivo, y del ángulo (μ) de los rayos de luz más oblicuos que puedan entrar al objetivo. La fórmula para calcular la AN es: $AN = N \times sen\ \mu/2$.

El aire tiene un índice de refracción de 1, que limita la resolución que se puede obtener, pero se puede incrementar la AN poniendo *aceite de inmersión* entre el espécimen y el objetivo, aumentando así el poder de resolución del microscopio. El aceite de inmersión tiene un índice de refracción de 1,5 lo cual aumenta considerablemente la AN y esto mejora el poder de resolución del microscopio.

Para obtener una imagen clara con detalles precisos en el microscopio óptico compuesto las muestras deben teñirse para que contrasten nítidamente con el medio que las rodea. Para lograr ese contraste es necesario cambiar el índice de refracción de la muestra al del medio, esto se logra tiñendo las muestras. En las condiciones habituales de trabajo el campo de visión de un microscopio óptico está iluminado de forma brillante. Cuando se enfoca la luz, el condensador produce una iluminación brillante (campo claro).

MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO

Se utiliza para examinar microorganismos vivos que no son visibles con el microscopio óptico común, que no pueden teñirse con los métodos estándares o que resultan tan distorsionados por la tinción que sus características no pueden identificarse. El sistema de iluminación está modificado de tal modo que la luz incide sobre la muestra sólo desde los lados. La única luz que es capaz de entrar en el objetivo es la que es dispersada por la muestra y, por lo tanto, los microorganismos se observan brillantes sobre un fondo oscuro. La resolución de dichos microscopios es bastante alta y pueden observarse en ellos objetos difícilmente percibidos por microscopía de campo claro o de contraste de fases. Se utiliza para examinar microorganismos no teñidos suspendidos en un líquido, por ejemplo, espiroquetas muy delgadas como *Treponema pallidum*, el agente causal de la sífilis.

MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES

Permite la observación detallada de estructura interna, cápsulas, endosporas, gránulos citoplasmáticos y movilidad en los microorganismos vivos. Además no es necesario fijar (adherir los microorganismos al portaobjetos) ni teñir las muestras, procedimientos que

podrían distorsionar o destruir a los microorganismos.

Este tipo de microscopia se basa en el hecho de que las células poseen un índice de refracción distinto al del medio y por lo tanto desvían los rayos de luz que las atraviesan. La luz que pasa a través de la muestra con índice de refracción diferente al del medio que la rodea sufre un cierto retardo. Este efecto es amplificado por un anillo especial que posee el objetivo, lo que da lugar a la formación de una imagen oscura sobre un fondo brillante.

MICROSCOPIO DE CONTRASTE POR INTERFERENCIA DIFERENCIAL (MCID)

Es similar al microscopio de contraste de fase en que utiliza diferencias en los índices de refracción. Sin embargo, un MCID emplea dos haces de luz en lugar de uno. Además los prismas dividen cada haz, lo que agrega colores contrastantes a la muestra. Por consiguiente, la resolución de un MCID es mayor que la del microscopio de contraste de fase estándar. Por otra parte, la imagen tiene colores brillantes y parece casi tridimensional.

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Se utiliza para visualizar muestras capaces de emitir fluorescencia, es decir, capaces de emitir una determinada longitud de onda cuando previamente ha incidido sobre ellas una luz de menos longitud de onda (ultravioleta). La fluorescencia puede ser debida a que determinadas células poseen sustancias fluorescentes naturales como la clorofila o por haber sido previamente tratadas con un colorante fluorescente (fluorocromo).

La auramina O brilla con un color amarillo cuando se expone a la luz UV, es fuertemente absorbido por *Mycobacterium tuberculosis*; *Bacillus anthracis* aparece de color verde manzana cuando se lo tiñe con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Estas técnicas son muy usadas en Ecología Microbiana y en diferentes técnicas de base Inmunológica dentro de su disciplina y en diferentes áreas de la Microbiología.

Una de las limitaciones de los tipos de microscopía óptica que se han descrito anteriormente es que las imágenes que se obtienen son esencialmente bidimensionales. Sin embargo, esta limitación se puede superar utilizando otros tipos de microscopios.

MICROSCOPIO CONFOCAL

La microscopía confocal (microscopía laser confocal de barrido) presenta algunas ventajas sobre la microscopía óptica convencional, como son su mayor contraste y elevada resolución, especialmente en aquellas células marcadas con fluorescencia. En estas células se incrementa notablemente la resolución axial (profundidad), permitiendo el seccionamiento óptico celular. De esta manera, es posible obtener representaciones tridimensionales celulares. Además, debido a que su fuente de iluminación es un láser, es posible localizar y observar conjuntamente distintos marcadores fluorescentes en la misma célula. Si la comparamos con la microscopía electrónica de transmisión, la microscopía confocal también puede proporcionar información relevante sobre la organización intracelular, aunque los aumentos son claramente inferiores. Las desventajas principales de la microscopía confocal radican en el elevado costo de la instrumentación requerida y la necesidad de personal especializado para su manejo.

Las aplicaciones de la microscopía confocal en el campo de la observación bacteriana son muy diversas. Una de las principales es el estudio de las comunidades microbianas presentes en biopelículas microbianas (placa dental, tapetes microbianos, etc.) y aquellas que conforman la estructura biológica de los flóculos de lodos activos. La microscopía confocal con análisis espectrofotométrico puntual permite la identificación de grupos bacterianos, sin la necesidad de utilización de sondas fluorescentes específicas, cuando las células presentan autofluorescencia. Mediante un análisis de espectro de absorción (excitación) y emisión a

distintas longitudes de onda, se puede realizar una caracterización espectrofotométrica "in situ" de la presencia de un determinado pigmento fotosensible en una célula. Mediante una deducción, razonamiento similar a la de los estudios quimiotaxonómicos que se realizan con cultivos bacterianos, podemos asociar la presencia de un grupo bacteriano con la existencia de una determinada molécula en la célula. Por ejemplo, la determinación de una ficobiliproteína (ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina) en el interior de una bacteria, indicaría que se trata de una cianobacteria.

3. MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS

En el microscopio electrónico se utiliza un haz de electrones en lugar de la luz; los electrones viajan en forma de ondas. El poder de resolución del microscopio electrónico es mucho mayor que el de los otros microscopios descritos anteriormente debido a que la longitud de onda de los electrones es alrededor de 100.000 veces menor que la de la luz visible.

En lugar de lentes de vidrio el microscopio electrónico posee lentes electromagnéticas para enfocar un haz de electrones sobre la muestra. Hay dos tipos de microscopios electrónicos: **el microscopio de transmisión y el microscopio electrónico de barrido.**

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)

El MET puede resolver objetos separados por una distancia tan corta como 2,5 nm y suele ampliarlos de 10.000 a 100.000A. El contraste se puede aumentar de forma notoria mediante el empleo de una "tinción" que absorba electrones y produzca una imagen más oscura en la región teñida. Generalmente, se utilizan sales de metales pesados como plomo, osmio, tungsteno o uranio. Dichos metales pueden fijarse sobre la muestra (*tinción positiva*) o utilizarse para aumentar la opacidad a los electrones del campo circundante (*tinción negativa*).

Debido a que los electrones tienen un poder de penetración limitado, sólo pueden estudiarse con eficacia cortes muy delgados (de alrededor de 100 nm), por consiguiente, la muestra no tiene un aspecto tridimensional. Por ejemplo, una célula bacteriana se corta con una cuchilla especial en varios cortes ultrafinos (de 20 – 60 nm de espesor) que son posteriormente visualizados de manera individual. Además, los preparados deben ser fijados, deshidratados y observados en condiciones de vacío estrictos.

Permite observar la ultraestructura microbiana y es especialmente útil para conocer el tamaño y forma de los virus. Permite visualizar detalles finos de flagelos, pilis, envoltura celular, membrana y estructura interna celular.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)

A diferencia del MET, el MEB proporciona una imagen tridimensional. Es especialmente útil para estudiar las estructuras superficiales de las células intactas y de los virus, en la práctica puede discriminar objetos separados por una distancia de apenas 20 nm y suele producir un aumento de 1.000 a 10.000A.

4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Confección de preparados para observación en fresco: técnica de montaje en fresco

La forma más simple de examinar microorganismos vivos es suspenderlos en agua u otro líquido, colocar una gota de esta suspensión en un portaobjetos y encima un cubreobjetos, utilizando para su observación al microscopio los objetivos secos (10 x a 40x).

Para evitar la evaporación y el efecto de las corrientes de aire, se puede rodear la preparación con vaselina, que cierra el espacio exterior entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Cuando la observación es inmediata no es necesario el uso de la vaselina.

Confección de preparados para coloraciones

En Microbiología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas. La fijación es un procedimiento que permite preservar estructuras celulares, se puede llevar a cabo con diferentes tratamientos: fijación por calor o fijación química. La fijación por calor es la más utilizada para la observación de bacterias, preserva la morfología externa de los microorganismos pero no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético entre otros, se utiliza para preservar las estructuras celulares.

Preparación y coloración de frotis

La forma más común de preparar un frotis es extender una pequeña cantidad de muestra sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, con un ansa en anillo, previamente esterilizada a la llama del mechero y enfriada. Luego, se seca el extendido al aire aunque puede acelerarse por calentamiento suave en la cercanía de la llama del mechero. Una vez seco, el preparado debe fijarse; una forma sencilla y rápida consiste en fijar por calor, pasando el frotis suavemente sobre la llama del mechero evitando un recalentamiento excesivo del vidrio. Esto impedirá el arrastre de los microorganismos por las soluciones de colorantes y lavados durante la coloración.

Coloraciones

Las coloraciones se usan para teñir a las células aumentando así su contraste, de tal manera, que puedan observarse más fácilmente en el microscopio de campo claro. En general, consisten en cubrir el frotis seco y fijado con una o más soluciones de colorantes. Los tiempos, cantidad y tipos de colorantes varían según el tipo de coloración empleada. Finalmente, se lava el portaobjetos con agua, se seca, se coloca una gota de aceite de inmersión y se observa al microscopio con objetivo de inmersión de 100x (Figura 2.2).

Los colorantes son compuestos orgánicos que tienen una afinidad particular por sustancias celulares específicas. Las propiedades ácidas o básicas de los colorantes permiten su fácil clasificación en:

Colorantes ácidos. Estos ionizan en soluciones acuosas para producir un núcleo colorante con carga negativa, es decir, el grupo iónico que imparte el color tiene carga negativa (anión). Dichos colorantes se combinan con constituyentes celulares cargados positivamente (proteínas). Por ejemplo: eosina, rojo Congo, fucsina ácida.

Colorantes básicos. En los que el ion que lleva el color tiene carga positiva. Dichos colorantes tienen afinidad por el material nuclear y otros componentes. Estos son los más usados en microbiología, ya que debido a la gran cantidad de ribosomas que contienen ácido ribonucleico en todo el protoplasma de la célula bacteriana, éstas se tiñen fácilmente. Por ejemplo: azul de metileno, fucsina básica, cristal violeta, safranina.

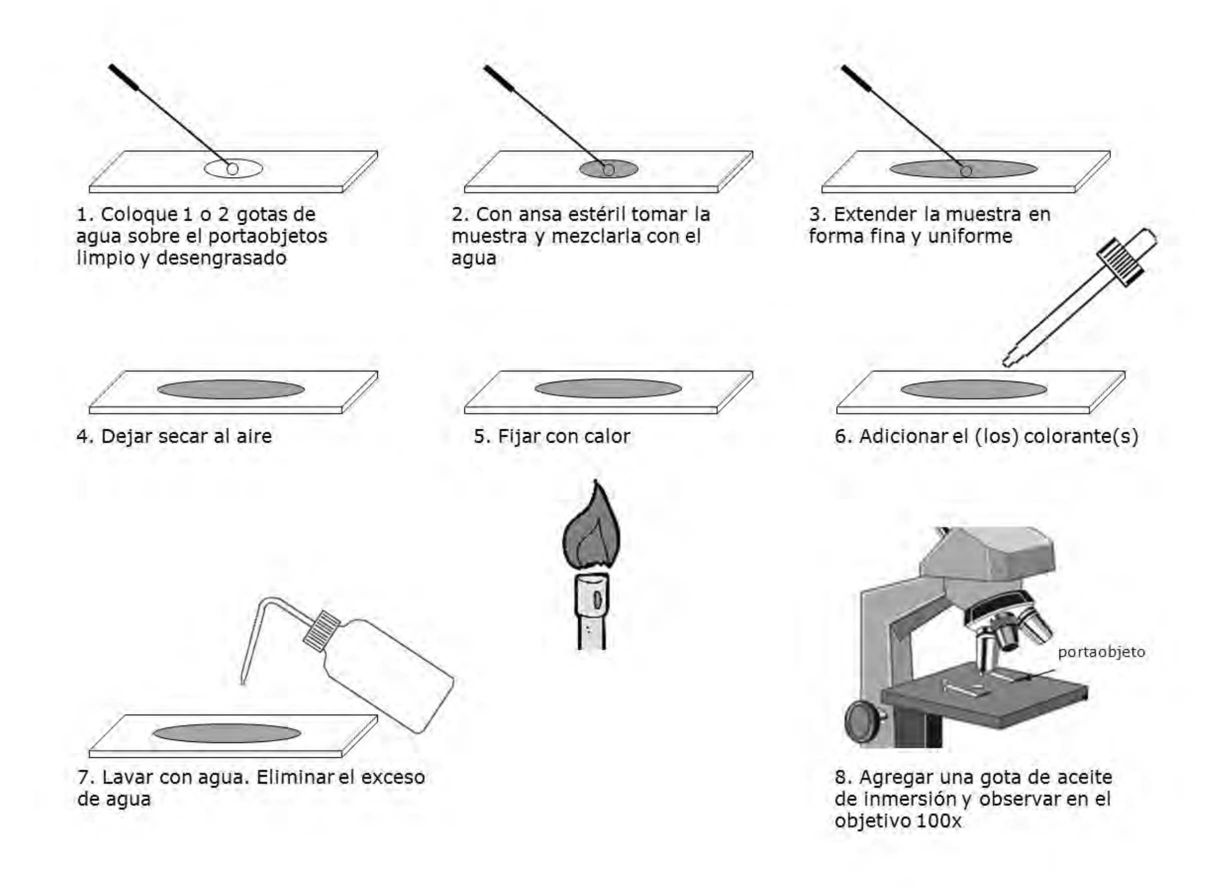


Figura 2.2. Preparación de un extendido o frotis y tinción simple

Para aplicar los colorantes básicos o ácidos los microbiólogos emplean diferentes clases de tinciones:

Tinción simple

Se utiliza un colorante, generalmente básico, como por ejemplo, azul de metileno, cristal violeta y fucsina. Todos los microorganismos toman el mismo color, con este tipo de coloración no se pretende diferenciar microorganismos o estructuras celulares. La tinción simple nos proporciona exclusivamente información acerca de la forma, tamaño y tipo de agrupación de los microorganismos. Sin embargo tiene la ventaja de ser un método muy sencillo y rápido.

Las técnicas de coloración simple pueden ser **positivas o negativas**. En las **tinciones positivas** el colorante es fijado por las células apareciendo los microorganismos de color oscuro o coloreado sobre un fondo luminoso o claro. Ejemplo: tinción de azul de metileno, tinción de Gram, etc. Mientras que, en las tinciones **negativas** los microorganismos no fijan el colorante, en cuyo caso el fondo es el que se tiñe y los microorganismos aparecen brillantes sobre fondo oscuro. Ejemplo: tinción con nigrosina.

Tinción diferencial

Se denominan así los procedimientos de coloración que ponen de manifiesto diferencias entre las células microbianas o entre subestructuras de una misma célula. Básicamente comprenden el empleo de más de un colorante, mordientes y/o decolorantes específicos.

Ejemplos: tinción de Gram, tinción de endosporas, etc.

Generalmente, en las tinciones diferenciales los microorganismos se tiñen con la ayuda de una sustancia química denominada *mordiente*. Una de las funciones de un mordiente es aumentar la afinidad de una muestra biológica por un colorante; otra es cubrir una estructura (como un flagelo) para darle mayor espesor y facilitar la observación después del teñido. Algunos ejemplos de mordientes son: soluciones de oxalato amónico, ácido tánico, sales de aluminio, estaño, zinc, cobre, iodo, etc.

5. TINCIONES COMÚNMENTE USADAS EN MICROBIOLOGÍA

Coloración de azul de metileno (tinción simple, directa, positiva)

Se cubre el frotis ya fijado con la solución de colorante durante aproximadamente 5 minutos. Lavar con agua, secar y observar al microscopio.

Coloración de Gram (tinción diferencial)

La tinción de Gram fue desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884 y es la tinción diferencial más utilizada de forma rutinaria y prácticamente la primera prueba a la que se someten las muestras de cualquier origen antes de su estudio. Proporciona una información esencial, sobre la forma, tamaño y agrupación celular. La tinción de Gram divide a las bacterias con pared del Dominio Bacteria en dos grandes grupos según el tipo y composición de la pared que presentan: bacterias con pared de tipo Gram positiva y bacterias con pared de tipo Gram negativa.

PROCEDIMIENTO

a) Preparar el frotis en la forma ya indicada.

b) Cubrir el frotis ya fijado con cristal violeta y dejar actuar durante 1 min.

c) Lavar con agua corriente, cuidando que no se arrastre la preparación.

b) Cubrir con solución de Lugol (I_3K), dejar actuar durante 1 min y lavar con agua.

c) Cubrir con alcohol-acetona, durante 10 s y lavar con agua (3 veces).

d) Cubrir con solución de fucsina básica o safranina (si se usa la fucsina fenicada se diluye 1/10), dejar actuar 30 s y lavar con agua. Secar y observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).

RESULTADOS

Con esta coloración las bacterias se presentan de dos colores distintos, las llamadas GRAM POSITIVAS, de color azul a violeta, y las llamadas GRAM NEGATIVAS, de color rosado a rojo (Figura 2.3).

FUNDAMENTO

Las bacterias reaccionan de modo distinto frente a la tinción de Gram porque las diferencias estructurales en sus paredes determinan la retención o el escape del complejo cristal violeta/yodo (lugol). Entre otras diferencias las bacterias Gram positivas tienen un peptidoglucano en su pared celular más grueso que las bacterias Gram negativas. Por otro lado, las bacterias Gram positivas presentan un polímero con un gran número de uniones cruzadas dando como resultando un plano de malla pequeña, mientras que, las bacterias Gram negativas presentan un polímero con pocos entrecruzamientos que determina una malla planal de "criba" o tamiz grande. Por lo tanto, al agregar el yodo se forma un complejo cristal violeta/mordiente con un tamaño molecular mayor al del tamiz del peptidoglucano de las bacterias Gram positivas y menor al tamiz de las Gram negativas. En consecuencia, cuando se decolora el preparado con alcohol o alcohol-acetona, las células Gram positivas retienen el

complejo colorante-mordiente y permanecen de color violeta. En cambio, en las células Gram negativas el alcohol altera la capa externa de lipopolisacárido y el complejo colorante/mordiente se elimina de la capa delgada de peptidoglucano. Como consecuencia, las células Gram negativas son incoloras hasta que se agrega el colorante de contraste rojo (fucsina o safranina), después de lo cual aparecen de color rosado.

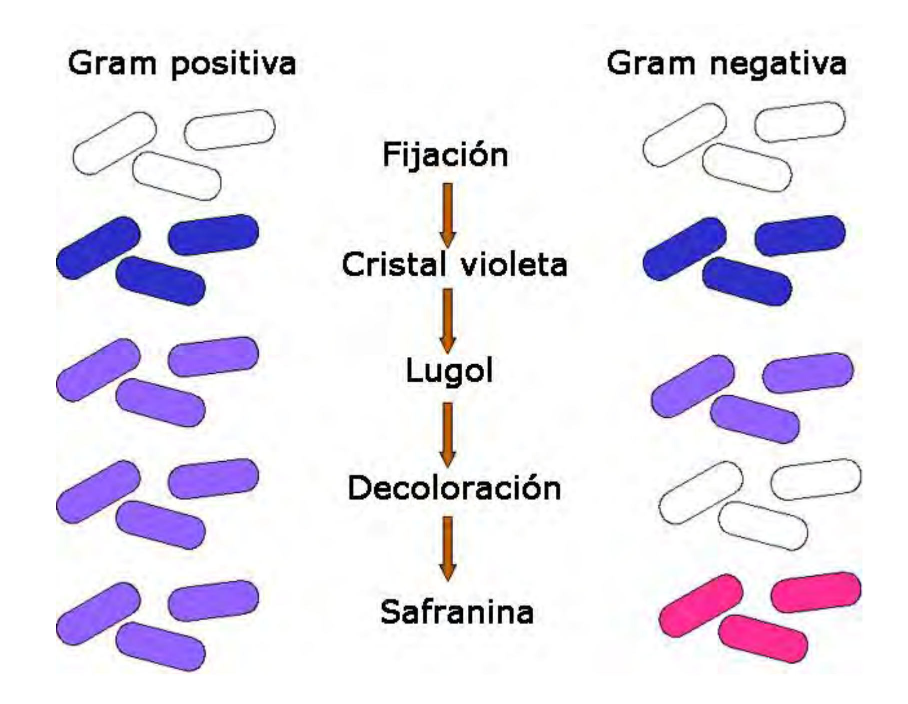


Figura 2.3. Tinción de Gram (http://www.mysvarela.nom.es/microbiologia/bacterias3.htm)

Coloración de Ziehl-Neelsen (tinción diferencial para bacterias ácido-alcohol resistentes)

Se trata de un procedimiento de tinción diferencial, conocido como método de Ziehl-Neelsen, que tiene gran relevancia por su aplicación clínica. Permite poder distinguir aquellos microorganismos cuya coloración resiste la acción de alcoholes y ácidos suaves (ácido-alcohol resistentes) de otros que no resisten la decoloración (ácido alcohol sensibles)

PROCEDIMIENTO

a) Sobre el preparado ya fijado se vierte la solución de fucsina de Ziehl sin diluir.

b) Se calienta hasta que empiecen a desprenderse vapores blancos, haciendo pasar por debajo del portaobjetos la llama de un hisopo embebido en alcohol. Se repite tres veces el procedimiento.

c) Dejar enfriar 5 min y lavar con agua.

d) Decolorar con una solución de ácido clorhídrico al 3% (V/V) en etanol de 95% (mezcla alcohol-ácido), hasta la decoloración casi total del frotis.

e) Lavar con agua.

f) Cubrir unos minutos con solución de Azul de Metileno (según Loeffler).

g) Lavar con agua, secar y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

RESULTADO

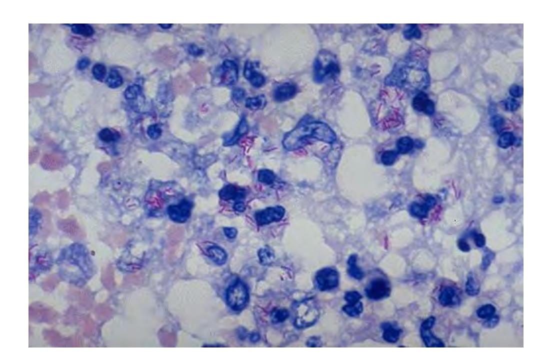
Las bacterias ácido-alcohol resistentes (bacilos de la tuberculosis, lepra y otras Micobacterias) se observan de color rojo sobre el contraste azul de otras células bacterianas o restos celulares

pertenecientes a los organismos sensibles a esta decoloración ácida (Figura 2.4).

FUNDAMENTO

Ciertos microorganismos especialmente los del género *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, etc.) y *Nocardia* tienen dificultades para colorearse con las tinciones simples y aún con la de Gram, por lo cual se los denomina bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Dichos microorganismos contienen una gran cantidad de ceras asociadas a la mureina de la pared celular. Estas ceras (lípidos sólidos) contienen ácidos grasos de cadena muy larga (ácidos micólicos) que serían la causa de la resistencia a los métodos habituales de tinción. Por lo tanto, es necesario usar una alta concentración del colorante primario (fucsina de Ziehl o carbolfucsina) y aplicar calor suave sobre la preparación (el calentamiento derrite la cera y aumenta la penetración y la retención del colorante). A continuación el extendido se trata con ácido-alcohol, un decolorante que elimina el color rojo de las bacterias que no son ácido-alcohol resistentes. Los BAAR retienen el color rojo porque las ceras vuelven a solidificarse al enfriarse y por lo tanto, no actúa el decolorante. Las células que no son ácido-alcohol resistentes permanecerán incoloras hasta que se coloree el extendido con azul de metileno, que actúa como colorante de contraste. Las bacterias que no son ácido-alcohol resistentes aparecerán de color azul después de la aplicación del colorante de contraste.



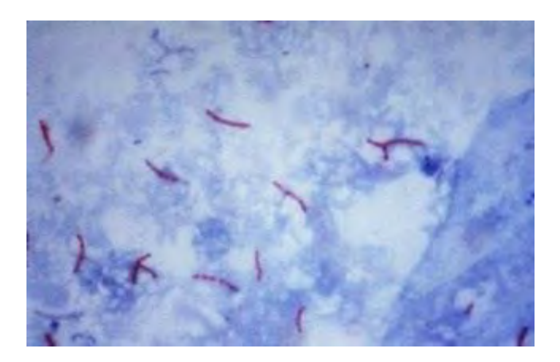


Figura 2.4. Tinción de Ziehl-Neelsen
(http://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n_de_Ziehl-Neelsen)

Coloración de endosporas (tinción diferencial)

Las endosporas bacterianas pueden distinguirse en las preparaciones microscópicas sin previa coloración debido a la gran refringencia de su protoplasma, que las diferencia de las células vegetativas. En las preparaciones teñidas por métodos comunes, las endosporas no se colorean debido a la resistencia que ofrece su gruesa cubierta a la impregnación por los colorantes habituales utilizados en la coloración de Gram y azul de metileno, permaneciendo incolora rodeada por la parte coloreada (vegetativa) de la bacteria. No obstante, es posible lograr la tinción de las endosporas por medio de métodos especiales en los que se emplea el calor como mordiente.

Las endosporas, debido a las características de sus envolturas no se tiñen con procedimientos habituales. El método más empleado es el de Schaeffer-Fulton donde la suspensión de microorganismos se tiñe en caliente con el colorante verde de malaquita, un colorante soluble en agua por cuya razón no se utiliza habitualmente en tinciones convencionales. El calor modifica la permeabilidad de las endosporas y permite la entrada del colorante a través de las capas externas. A continuación, el lavado con abundante agua produce la decoloración de las formas vegetativas así como de los extremos de las bacterias esporuladas, que se tiñen por último con un colorante de contraste, la safranina

PROCEDIMIENTO

a) Realizar un frotis colocando una capa fina del cultivo sobre el portaobjeto, dejar secar y fijar con la mínima cantidad de calor.

b) Cubrir la preparación con solución al 5% de verde de malaquita, calentar con hisopo hasta la emisión de vapores y dejar enfriar durante 5 min.

c) Lavar con agua.

d) Colorear durante 30 s con solución acuosa de safranina al 0,5%.

e) Lavar con agua, secar con papel y observar con el objetivo de inmersión.

RESULTADOS:

Las endosporas se tiñen de verde y las células vegetativas de rojo a rosado (Figura 2.5).

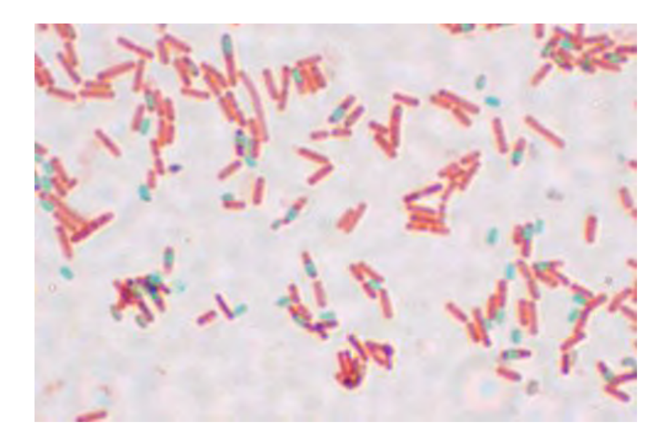


Figura 2.5. Tinción de endosporas (http://es.wikipedia.org/wiki/Endospora)

Coloración de cápsulas bacterianas (tinción negativa)

Las cápsulas bacterianas no tienen la misma afinidad por los colorantes que otros componentes de la misma, por lo que se emplean coloraciones especiales. Algunas, colorean la célula y el fondo, pero no la cápsula, de manera que ésta se aprecia por contraste (método de Anthony). Otras se basan en colorantes diferenciales cuando la cápsula toma un colorante y la bacteria otro (método de Muir). Existe otro procedimiento que utiliza el principio de la coloración negativa, en el cual las cápsulas se observan como un halo claro contra un fondo oscuro (método de la tinta china).

PROCEDIMIENTO

a) Colocar sobre un portaobjetos una pequeña cantidad de solución fisiológica, agua o caldo, con un ansa en anillo, dispersar en ella una pequeña cantidad del inóculo bacteriano joven.

b) Agregar con un ansa en anillo, una pequeña cantidad de tinta china, mezclar bien y cubrir inmediatamente con un cubreobjetos, dejando que el líquido se extienda formando una delgada película. Se debe evitar la formación de burbujas de aire en el preparado.

c) Examinar con el objetivo de inmersión.

FUNDAMENTO

La cápsula desplaza a las partículas de carbono coloidal de la tinta china, apareciendo un halo claro alrededor del microorganismo (Figura 2.6.A).

Coloración de flagelos (tinción diferencial)

Los flagelos bacterianos son estructuras de locomoción demasiado finas para visualizarlos con el microscopio óptico sin tinción. Para lograr su coloración se trata de engrosarlos aplicando soluciones coloidales inestables de ácido tánico, que se depositan sobre estas estructuras

engrosando el diámetro aparente de los mismos, de tal manera que se hacen visibles al microscopio óptico con una tinción con fucsina básica (Figura 2.6.B). En la coloración de flagelos requiere mucho cuidado la fijación de la bacteria en la confección del preparado, dado la facilidad con que pueden desprenderse los flagelos por daños mecánicos.

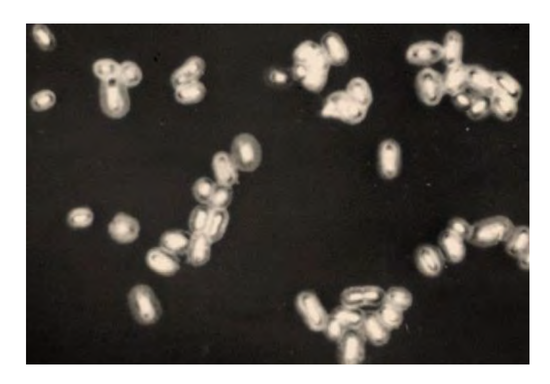
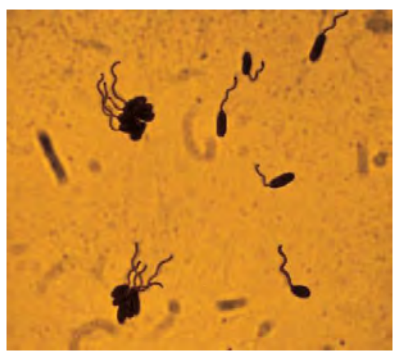



Figura 2.6. A) Tinción de cápsula con tinta china, **B)** Tinción de flagelos

6. Bibliografía

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2014). Un breve viaje por el mundo microbiano. En: ***Brock Biología de los microorganismos***. 12º Edición. Editorial Pearson Educación, S.A., pág. 28−37.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2002). The Study of Microbial Structure: Microscopy and Specimen Preparation. En: ***Microbiology***. Editorial McGraw Hill, United States.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2007). Observación de los microorganismos a través del microscopio. En: ***Introducción a la Microbiología***. 9º Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.

Vázquez C, Martín A, Silóniz MI, Serrano S. (2010). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3 (5): 15-38.

TEÓRICO PRÁCTICO 2. MICROSCOPÍA Y COLORACIONES

Ud. se presenta a una entrevista de trabajo a un laboratorio dedicado al diagnóstico microbiológico. Para evaluar su desempeño en el laboratorio le dan 5 tubos de cultivos de microorganismos puros y sólo le dicen que se trata de cultivos de bacterias, hongos filamentosos o levaduras. Le piden que **los identifique presuntivamente** (tamaño, forma, agrupaciones y comportamiento tintorial) utilizando microscopia y coloraciones, para lo cual dispone de todos los reactivos necesarios y de un microscopio de campo claro, de campo oscuro, de contraste de fases, de contraste por interferencia diferencial, de fluorescencia, confocal y electrónico.

1) ¿Qué tipo de microscopio utilizaría, según lo que le piden? ¿Por qué?

2) ¿Qué procedimiento realizaría para determinar si los microorganismos presentes en los tubos son bacterias, hongos filamentosos o levaduras? Fundamente su respuesta. (Ayuda: tenga en cuenta el tamaño de una célula procariota y de una eucariota). ¿Qué podemos evaluar en dichas preparaciones?

3) Luego de realizar el procedimiento del punto 2, decide seguir trabajando sólo con los cultivos bacterianos. ¿Qué procedimiento realizaría para observar estos cultivos? Explique los pasos para poder observar dichos cultivos. ¿Qué precauciones debería considerar para no afectar la visualización de la muestra? ¿Qué podemos evaluar en dichas preparaciones? (Ayuda: tenga en cuenta forma y agrupaciones bacterianas).

4) ¿Cuál es la primera coloración que debería realizar? ¿Cuál es el fundamento de la misma? ¿Qué información le da? ¿Cuál es la función que desempeña cada uno de los reactivos que usa? ¿Qué paso de la coloración podría ser omitido sin alterar la diferenciación de las bacterias? Explique.

5) Al realizar la coloración elegida en el punto 4, Ud. observa que uno de los cultivos presenta "estructuras" refringentes, sin colorear y con diferentes ubicación en dichas bacterias. ¿Qué estructuras podrían ser? ¿Qué coloración emplearía para determinar de qué estructuras se tratan? Fundamente dicha coloración. ¿Observaría dichas estructuras refringentes si omite el paso de calentamiento? ¿Observaría dichas estructuras si emplea azul de metileno en lugar del último colorante? Justifique.

6) Luego de realizar las coloraciones del punto 4 y 5, aún no puede identificar el microorganismo de uno de los tubos. Entonces, le dicen que el cultivo proviene de un esputo de un paciente presuntamente infectado con *Mycobacterium tuberculosis.* ¿Por qué no pudo teñirlos con los colorantes utilizados en el punto 4? Fundamente. ¿Cuál es el fundamento de la coloración que debería utilizar? Si omite el paso de calentamiento, ¿de qué color se observan dichas bacterias?

7) Ya casi termina, pero le dicen que dos cultivos presentan otras "estructuras facultativas" que no pueden ser visualizadas con las coloraciones que ha utilizado hasta el momento. ¿De qué estructuras pueden tratarse? ¿Cómo pueden ser puestas en evidencia dichas estructuras? ¿De qué dependerá el éxito de las coloraciones? Fundamente su respuesta.

8) Debido a que el laboratorio cuenta con diferentes microscopios, como última prueba le dan distintos preparados para que elija qué tipo de microscopio utilizaría para observarlos. En todos los casos, fundamente su respuesta.

a) Células bacterianas no teñidas, pequeñas y no necesita ver los detalles.
b) Tejidos viables no teñidos cuando se desea ver algunos detalles intracelulares.
c) Una muestra que emite luz cuando se la ilumina con luz UV
d) Detalles intracelulares de una célula de 1 µm de longitud.
e) Células vivas no teñidas en las cuales se observan estructuras intracelulares en color.

LABORATORIO 1.
MICROSCOPIA Y COLORACIONES

OBJETIVOS

– Aprender el manejo y cuidado del microscopio óptico de campo claro.

– Aprender las técnicas de preparación de frescos, de fijación y coloraciones más utilizadas en el estudio microscópico de cultivos bacterianos, obtenidos de medios sólidos y líquidos.

– Identificar las principales formas bacterianas y la importancia de las tinciones simples y diferenciales en la caracterización morfológica de dichos microorganismos.

– Observar y caracterizar someramente, mediante observación macroscópica y microscópica, la diversidad microbiana de un ambiente elegido por el estudiante.

DESARROLLO PRÁCTICO

Primer día:

a) Observación microscópica de preparados en fresco y coloreados que se brindarán al estudiante para que determine: forma, agrupación y comportamiento tintorial de los microorganismos, comparándolos con los efectuados por él mismo.

b) Observación de la diversidad microbiana: Llevar una placa de Petri cerrada conteniendo agar nutritivo, con cuidado de que no se abra durante el transporte, al ambiente cuya carga microbiológica se desee evaluar. Retirar la tapa y dejar la placa abierta, durante aproximadamente 30 minutos. Pasado este tiempo, cerrar la placa e incubarla a temperatura de 25-30º C, durante 2 a 5 días.

Segundo día:

Confección de preparados para observación en fresco

a) Observación de la presencia de microorganismos en preparados en fresco, de diferentes materiales de origen natural o de cultivos provenientes de dichos materiales.

A partir de materiales líquidos: agua estancada, vinagre, suspensión de levaduras, leche.

Tomar directamente, o previa centrifugación, con el ansa en anillo, una gota del material y depositarla sobre un portaobjetos desengrasado y limpio. Cubrir con un cubreobjetos y observar al microscopio (40x).

A partir de material semisólido: pus, esputo, yogurt, etc.

Colocar 1 o 2 gotas de diluyente (agua, solución fisiológica, etc.) sobre un portaobjetos. Tomar con el ansa en anillo el material en estudio y disgregar en la gota sobre el portaobjetos. Colocar un cubreobjetos y observar al microscopio (40x).

A partir de un material sólido: alimentos, materia fecal, tierra u otros.

Colocar en un tubo de ensayo 2 a 4 gotas de solución diluyente. Agregar el material y agitar hasta obtener una suspensión homogénea. Tomar el material contenido en el tubo con el ansa (previamente esterilizada a la llama y enfriada al aire cerca del mechero), y apoyarla sobre el portaobjetos, repetir las veces que sea necesario para obtener un volumen adecuado. Dejar caer sobre la gota un cubreobjetos y observar al microscopio óptico (40x).

Confección de frotis para coloraciones

Se realizarán diferentes coloraciones, tales como, Azul de Metileno, Gram, Ziehl-Neelsen y Schaeffer y Fulton (Verde de Malaquita) de extendidos realizados con materiales disponibles y su posterior observación al microscopio óptico.

Sobre un portaobjetos limpio y desengrasado extender con el ansa el material en suspensión adecuadamente. Dejar secar el extendido (puede acelerarse con calor suave). Fijar el extendido pasándolo aproximadamente tres veces por la llama del mechero, dejar enfriar y colorear según se indique.

Observación de la diversidad microbiana

Se observará diversos tipos de colonias en las placas expuestas el primer día de práctico. Se anotarán las características más importantes de las colonias (Figura 2.7) y se realizará un estudio microscópico de cada una de ellas, haciendo preparados en fresco, frotis y diferentes coloraciones con la finalidad de observar comportamiento tintorial, forma, tamaño, agrupaciones de las células, presencia y ubicación de las endosporas. En el caso de observar colonias filamentosas se realizarán montajes en fresco y se evaluará presencia de micelio cenocítico y/o tabicado y estructuras de reproducción.

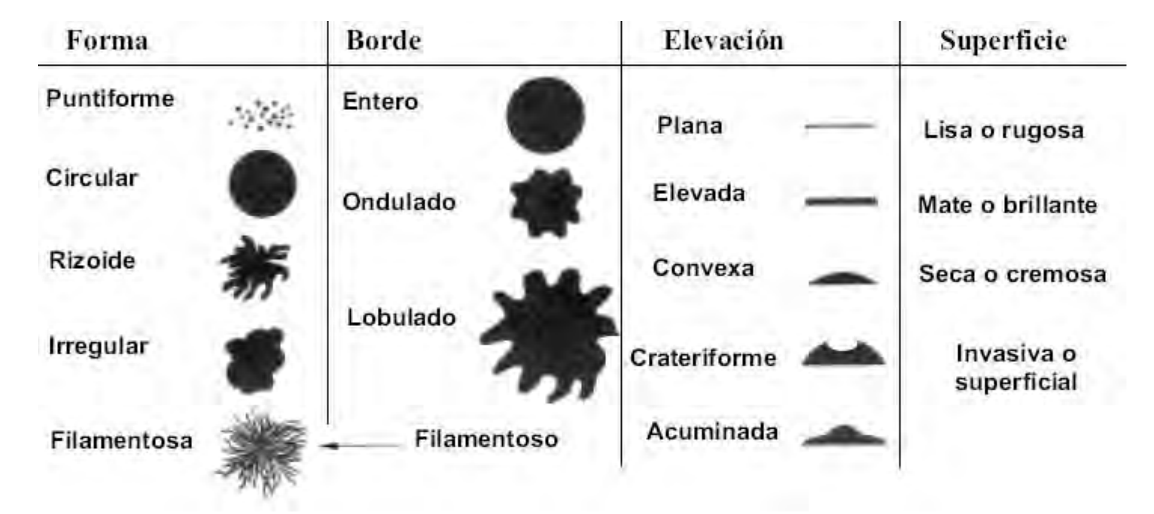


Figura 2.7. Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas aisladas sobre medio sólido tras la exposición de las placas a un ambiente particular.

RESULTADOS

Informar: forma, agrupación, tamaño relativo y comportamiento tintorial de cada uno de los microorganismos y/o colonias observadas.

TRATAMIENTO DE LOS MATERIALES USADOS

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte los cubreobjetos y portaobjetos en un frasco con solución de hipoclorito de sodio al 5% destinado para tal fin
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

CAPÍTULO III. ESTERILIZACIÓN y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. Introducción

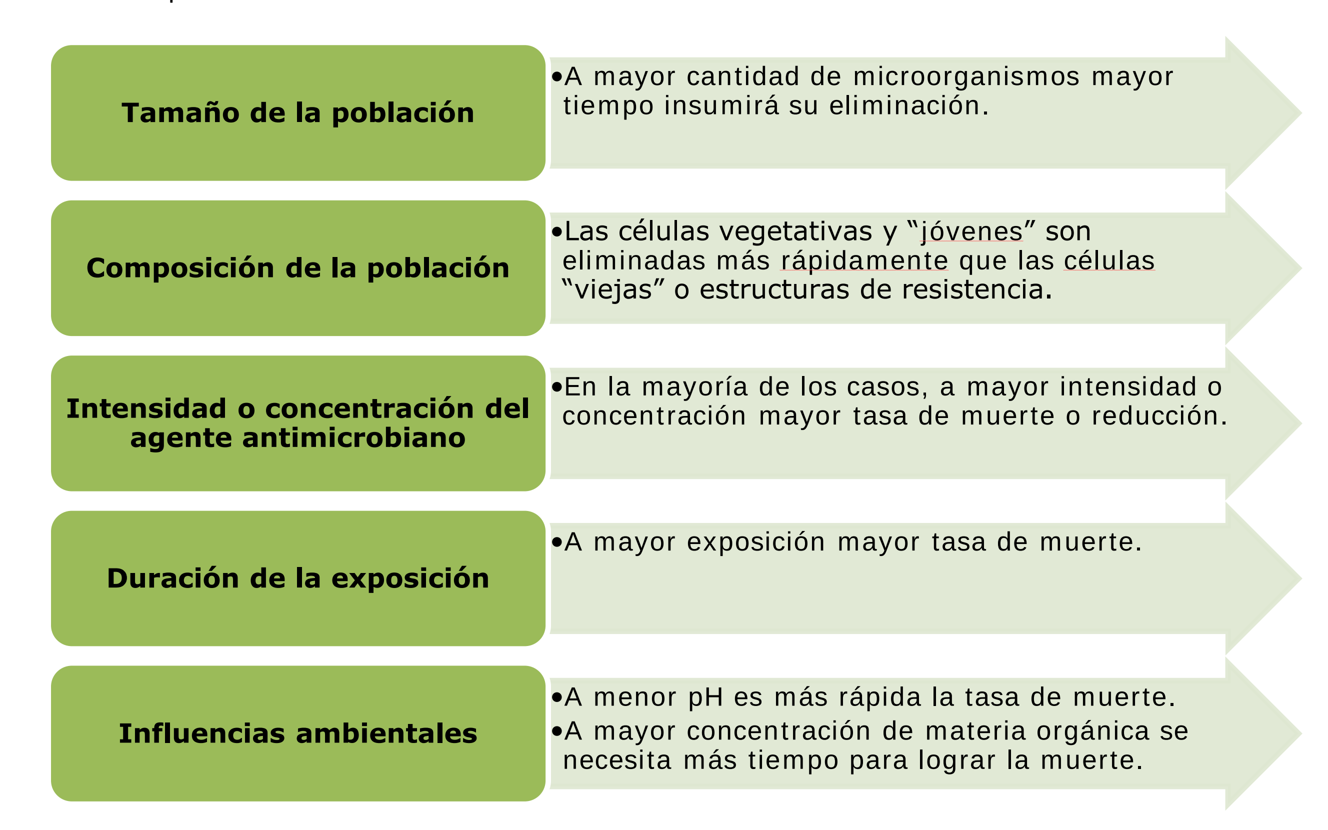
Los microorganismos se encuentran en la naturaleza, como todos los seres vivos, inmersos en un medio ambiente. El estado fisiológico y capacidad de desarrollo microbiano dependen de la actividad metabólica, dirigida por numerosas enzimas y proteínas celulares codificadas por el material genético, y por otra parte, condicionados por el medio ambiente. Los microorganismos se encuentran bajo la influencia de factores físicos y químicos, los cuales ejercen en su crecimiento y desarrollo un efecto decisivo, favorable o desfavorable. En la práctica médico-quirúrgica de las enfermedades transmisibles, en el trabajo del laboratorio microbiológico y en la higiene y saneamiento de locales, personas, animales y alimentos se destaca el rol de todo procedimiento, técnica o producto que suprima o disminuya la viabilidad de los microorganismos patógenos.

Los principios que rigen los mecanismos de acción de los agentes físicos, químicos o mecánicos son herramientas utilizadas en el control del crecimiento microbiano y sirven de base a las prácticas de esterilización, desinfección, antisepsia y sanitización.



Los conceptos anteriormente descriptos suelen usarse con frecuencia incorrectamente o se confunden cuando se habla del control microbiano, por ello es importante comprender cuál es el alcance de cada uno de ellos. Hay sufijos que se pueden utilizar para denotar el efecto de un agente físico o químico sobre los microorganismos. Un agente **biocida o germicida** “mata” a los microbios, mientras que un agente **bacteriostático o fungistático** (statico=detener) inhiben el crecimiento y multiplicación; una vez eliminado el mismo podría reanudarse el crecimiento.

La destrucción o inhibición del crecimiento microbiano por parte de un agente antimicrobiano es afectada por diversos factores:



Para microorganismos, el único criterio válido de **muerte** es la pérdida irreversible de la capacidad para reproducirse. El mecanismo de los procesos de "muerte" difiere de acuerdo al método empleado, alcanzando el mismo efecto: *proteínas o macromoléculas esenciales de la célula son inactivadas interfiriendo con el ciclo metabólico celular y bloqueando su capacidad de desarrollo y reproducción*.

2. ESTERILIZACIÓN

Dentro del concepto de **esterilización,** se analizarán cuáles son los diferentes métodos de esterilización que se pueden aplicar y cuáles son sus utilidades prácticas. Existen diferentes métodos:



2.1. MÉTODOS FÍSICOS

TEMPERATURA

Los microorganismos viven dentro de rangos amplios de temperatura, variable para cada especie microbiana, distinguiéndose dos límites (superior e inferior) denominados **temperatura máxima, y temperatura mínima**, respectivamente. La actividad máxima de los sistemas enzimáticos de los seres vivos se alcanza a una temperatura óptima que determina la velocidad de crecimiento. La velocidad de crecimiento desciende bruscamente después del límite superior de temperatura. El descenso rápido a temperatura elevada es debido a la desnaturalización térmica de las proteínas enzimáticas y de las estructuras celulares con constituyentes proteicos (membrana). Por ello, el calor es el agente letal más ampliamente utilizado en la esterilización. Su acción esterilizante depende de su naturaleza, intensidad y tiempo de aplicación; del grado de humedad y del pH del medio y de la susceptibilidad diferencial a la temperatura, de cada microorganismo en particular.

Calor húmedo

El calor húmedo requiere menos tiempo como agente esterilizante con respecto al calor seco debido a que el agua es un buen conductor del calor, de esta manera el calor penetra mejor y se distribuye más uniformemente. Las proteínas enzimáticas y estructurales son estables en parte, por puentes hidrógeno y enlaces disulfuro. En presencia de humedad se establecen puentes H con las moléculas de agua. Se reorganizan las nuevas cadenas peptídicas con formación de complejos proteicos no funcionales. De esta manera, el calor húmedo mata los microorganismos por desnaturalización de las estructuras proteicas.

La esterilización confiable con calor húmedo requiere temperaturas superiores a la de la ebullición del agua. Estas temperaturas elevadas se alcanzan con más frecuencia mediante vapor **de agua saturado a presión** y su aplicación requiere de un aparato llamado **AUTOCLAVE** (Figura 3.1).

Dicho aparato, consiste de un recipiente metálico de doble pared, con una tapa que ajusta a presión por medio de tornillos, un manómetro que indica la presión a la que llega el vapor, una espita que regula la salida del vapor, una válvula de seguridad, una rejilla de bronce donde se coloca el material a esterilizar, un depósito de agua y una fuente de calor. La duración y temperatura del tratamiento usado, para lograr una esterilización adecuada es: 121º C (1 atmósfera) durante 15 minutos o 115º C (3/4 atmósfera) durante 20 minutos.

Para lograr una **correcta** esterilización en autoclave es necesario cumplir con los siguientes requisitos:

- Controlar el nivel de agua
- La espita debe permanecer abierta hasta lograr que salga un flujo constante de vapor, lo cual indica que todo el aire ha sido sustituido por vapor de agua. Si queda atrapado aire, la temperatura disminuirá, siendo inferior a la que se consigue con vapor saturado a la misma presión. La presión no es la que causa la muerte de los microorganismos, sino la temperatura del vapor a presión.
- El autoclave no debe cargarse excesivamente, ya que se forman bolsas de aire que disminuyen la temperatura de esterilización.
- El tiempo de esterilización depende de la naturaleza del material, del recipiente que lo contiene y del volumen a esterilizar.
- Los objetos voluminosos requieren un tiempo de tratamiento mayor para que el calor penetre hasta el centro del material.
- Deberá leerse, siempre que sea posible, la temperatura y la presión.

Las principales **fallas** en la esterilización por autoclave se deben a:

- mal funcionamiento del equipo.
- selección de un programa inadecuado (tiempo de exposición o temperatura).

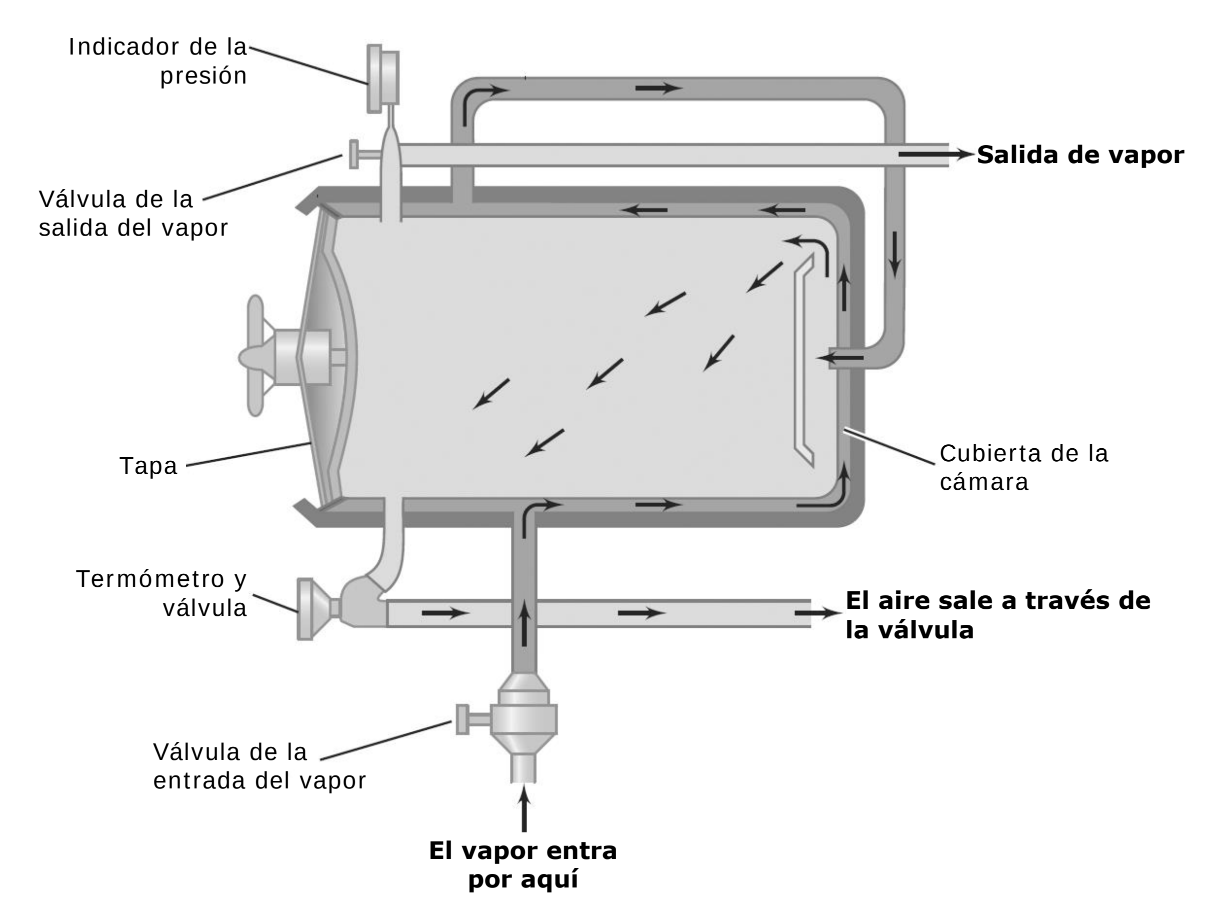


Figura 3.1. Esquema de un autoclave (Fuente: Ingraham J & Ingraham C. Introducción a la Microbiología. Ed Reverté SA, España, 1998)

Las principales **aplicaciones** del calor húmedo son:



Calor seco

El calor seco requiere mayor duración e intensidad, con respecto al calor húmedo, cuando es empleado como agente esterilizante, porque la conducción del calor es menor en el aire que en el vapor. Además, en ausencia de agua, la estructura nativa de una proteína está estabilizada por puentes hidrógeno y enlaces disulfuro. En este estado, la resistencia al calor de las células bacterianas y de las endosporas en estado de desecación es mayor. El calor seco destruye los microorganismos por oxidación de sus constituyentes intracelulares.

La tabla 3.1 muestra los distintos métodos de esterilización por calor seco y la utilidad de los mismos en las prácticas de laboratorio. Entre los métodos descriptos y para poder aprovechar el poder esterilizante del aire caliente es necesario el empleo de ciertos aparatos conocidos con el nombre de **ESTUFAS**. Una estufa de esterilización consta de una cabina metálica de doble pared, con resistencia eléctrica; un termostato, un termómetro y estantes para colocar el material a esterilizar. El aire caliente circula por el espacio existente entre la doble pared transmitiendo el calor a los objetos que se encuentran en los estantes de la estufa.

Generalmente, el tiempo y la temperatura del tratamiento para lograr una correcta esterilización es: 180 – 160º C durante 1 h – 1 ½ h, respectivamente. Los tiempos y la temperatura pueden variar según las condiciones de trabajo, tales como cantidad y calidad del material.

Tabla 3.1. Métodos de esterilización por calor seco

Método	Comentario	Uso
Incineración	Se utiliza cuando se puede destruir o alterar la naturaleza de los materiales contaminados, sin que ello revista demasiada importancia. Se logra por combustión directa o mediante el uso de un horno crematorio.	Recipientes de cartón, apósitos, ropas, cadáveres de animales.
Flameado o calor directo	Los materiales se calientan a la llama de un mechero Bunsen. El procedimiento se realiza a temperaturas mayores de 200º C durante minutos o segundos. Causa deterioro del material tratado.	Boca de tubos, agujas, ansas, puntas de bisturí, varillas de vidrio, espátula de Drigalsky, tijeras, pinzas y demás instrumentos metálicos.
Cono de esterilidad	El mechero Bunsen genera un cono de esterilidad debido a una corriente ascendente de aire caliente que evita el descenso de las partículas en suspensión del aire.	La extracción de muestra o la siembra de un cultivo microbiano deben realizarse en el área que abarca el cono de esterilidad, para evitar la contaminación ambiental.
Estufa u horno de aire caliente	La acción letal resulta del calor transmitido por el material con el cual los organismos están en contacto y no desde el aire caliente que los rodea.	Este procedimiento debe utilizarse para esterilizar materiales termoestables, deshidratados y que deban estar secos en el momento de su uso.

Para lograr que el procedimiento sea adecuado se deben considerar los siguientes factores:

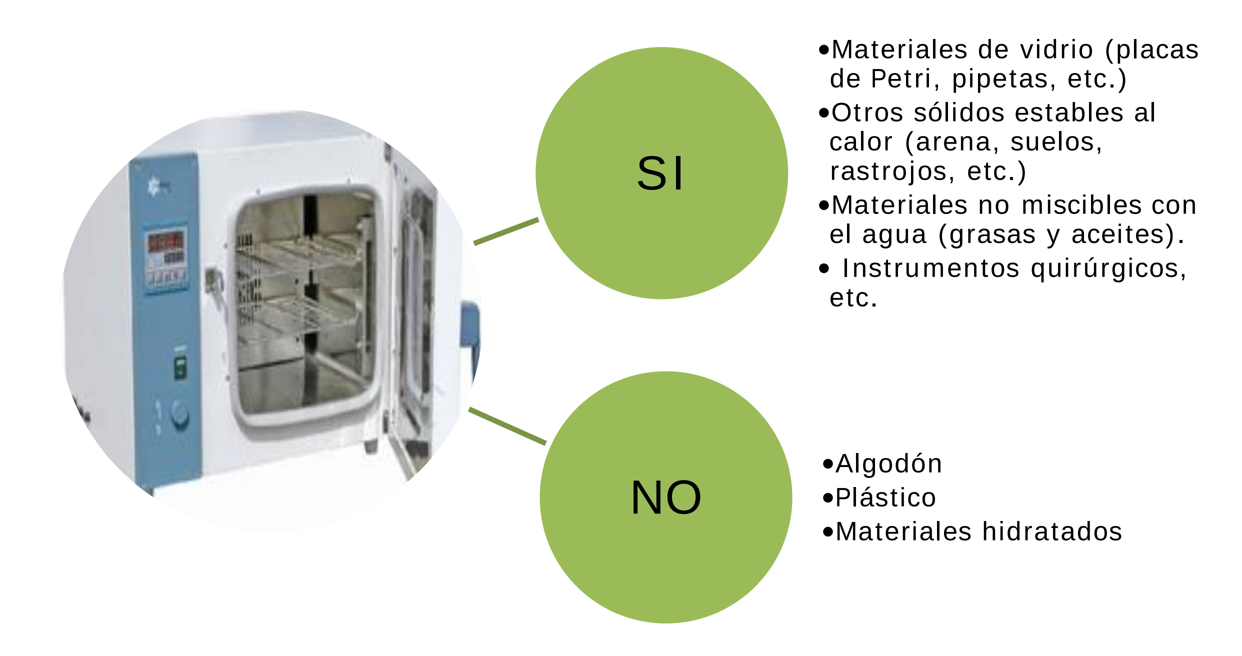
- El tiempo de precalentamiento de la estufa y de los materiales.

- El grado de conductividad del calor de los materiales. Se recomienda dejar espacios entre los materiales que permitan la circulación de aire caliente entre los mismos.

El fracaso de la esterilización puede atribuirse a:

- Control defectuoso de la temperatura.
- Pérdida de penetración del calor.
- Presencia de organismos con una resistencia superior frente a la temperatura aplicada.

Las principales **aplicaciones** del calor seco son:



RADIACIONES

Se puede definir **radiación** como la propagación de energía por el espacio. Los principales tipos de radiaciones que pueden tener efectos sobre los seres vivos son:

Radiación electromagnética	λ (longitudes de onda, en nm)
Radiación infrarroja (IR)	$800-10^6$
Radiación visible	380-800
Ultravioleta (UV)	13,6-380
Rayos X	0,14-13,6
Rayos γ	0,001-0,14
Rayos cósmicos	< 0.001

A medida que disminuye la longitud de onda, aumenta la energía de la radiación y causa alteraciones (ruptura, ionización) de las macromoléculas celulares (ADN y proteínas).

Las radiaciones ionizantes tienen corta longitud de onda. Las fuentes de radiaciones ionizantes son los aparatos de rayos X, los rayos gamma (γ) y los radioisótopos, como el Co^{60} o el Cs^{137}.

Los efectos de las radiaciones ionizantes dependen de la **dosis de exposición**, o sea, de la cantidad de radiación a que se somete un material. En la práctica, la unidad que se emplea en biología es el megarad (Mrad), equivalente a un millón de rads, y que es el rango de la dosis requerida para esterilizaciones. También se emplea el Gray (1Gy equivale a 100 rads).

En general, los microorganismos son más resistentes a las radiaciones ionizantes que los seres superiores. Por ejemplo, la dosis de reducción decimal (D10) para las endosporas de ciertas especies de *Clostridium* es de 2000-3000 Gy. Las células vegetativas de la bacteria *Deinococcus radiodurans* es de 2.200 Gy. Otras especies más "normales" poseen una dosis de reducción decimal en torno a 200-600 Gy. Compare estos datos con el valor de sólo 10 Gy como dosis *letal* para humanos.

Los **efectos** de las radiaciones ionizantes son letales, tanto directos como indirectos, así como mutagénicos. Los efectos letales directos se logran a altas dosis de radiación, mientras que los letales indirectos y mutagénicos se consiguen a menores dosis.

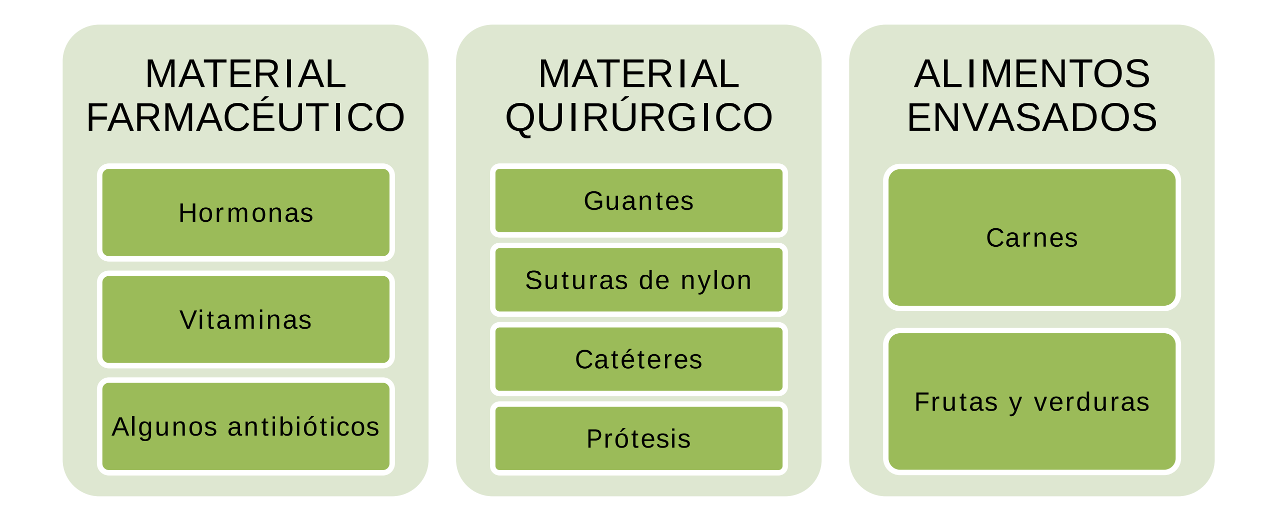
1. **Efecto letal directo**: por impacto de cuantos de radiación ionizante sobre alguna molécula esencial para la vida. Los estudios cuantitativos demuestran que debe existir una molécula vital única que, al ser alterada, provoca la muerte. Esta molécula debe ser el ADN (ya que obviamente es absolutamente esencial y suministra una sola copia de la mayoría de los genes microbianos), y no las proteínas, de las que existen muchas copias en la célula, y que podrían regenerarse. Los daños al ADN son, principalmente: roturas en ambas cadenas, y entrecruzamiento entre dichas cadenas, que no puedan repararse.
2. **Efecto mutagénico**: deriva de la producción de daños menores al ADN que pueden repararse por mecanismos propensos a error.
3. **Efecto letal indirecto**: este tipo de efecto es el más importante, y deriva de la **radiólisis del agua** que provoca la aparición de radicales hidroxilo (OH^-) y radical H libre (H^+). El radical H libre es un potente reductor, y el radical hidroxilo es un potente oxidante. El radical hidroxilo reacciona fácilmente con macromoléculas, sobre todo con ADN, provocando roturas en ambas cadenas, lo cual se traduce en efectos de letalidad. Si, además, el microorganismo está expuesto al oxígeno mientras se lo está irradiando, el efecto es aún más intenso, debido a que el O_2 reacciona con los radicales libres, originando cadenas de reacciones de **autooxidación**, muy destructivas y promoviendo la **formación de peróxidos y epóxidos**, asimismo letales:

$$H^{\cdot} + O_2 \text{------>} {}^{\cdot}HO_2$$

$$2\ {}^{\cdot}HO_2 \text{------>} H_2O_2 + O_2$$

La dosis de esterilización por radiación se suele establecer en 12 veces la dosis de reducción decimal (12 D10) requerida frente a las endosporas de *Clostridium botulinum*. Debido al gran poder penetrante de las radiaciones hay que mantener unas normas y controles de seguridad muy estrictos en su manipulación: planchas protectoras de plomo y revisiones periódicas de los manipuladores.

Las principales **aplicaciones** de las radiaciones ionizantes son la esterilización de:



Las radiaciones ionizantes no pueden ser utilizadas para esterilizar soluciones proteicas sujetas a desnaturalización ni para materiales que se oxidan o termolábiles. Las vendas y gasas de algodón pueden sufrir daño en sus fibras.

2.2. MÉTODOS MECÁNICOS

Filtración

La filtración se usa para remover los microorganismos de soluciones termolábiles que obviamente no pueden ser esterilizadas por calor. Los compuestos sensibles al calor tales como: suero de animales, soluciones de enzimas, algunas vitaminas y antibióticos, son filtrados antes de ser adicionados a un medio de cultivo. En la filtración se usan membranas capaces de retener microorganismos por el pequeño tamaño de los poros del filtro y en parte por la adsorción a las paredes del poro debido a la carga eléctrica del mismo y de los microorganismos.

Los factores que deben considerarse para realizar una correcta filtración son:

- Porosidad del filtro empleado
- Carga eléctrica del material filtrante.
- Carga eléctrica de los microorganismos.
- Naturaleza del líquido filtrado.

En la práctica se utilizan principalmente dos tipos de filtros:

Filtros de membrana: son discos de acetato de celulosa (discos Millipore), nitrato de celulosa, policarbonato, poliéster o polipropileno con poros de tamaño uniforme que varían de 0,05 a 1 μm. En la actualidad los de mayor utilidad son los de poros 0,45 μm (clarificantes) y 0,2 μm (esterilizantes), ambos son descartables.

La filtración se realiza por aplicación de presión positiva o negativa. Una vez armado el equipo de filtración (Figura 3.2.A), se envuelve en papel metalizado y papel blanco y se esteriliza en autoclave a 3/4 atm, durante 30 min. Se debe procurar el enfriamiento del filtro antes de ser retirado del autoclave para evitar su ruptura.

Filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air): están compuestos por pliegues de acetato de celulosa que retienen las partículas (incluidos los microorganismos) del aire que sale de la cabina de seguridad biológica (Figura 3.2.B). Son de gran utilidad en unidades de aislamiento (sala de prematuros, quemados, pacientes bajo tratamiento inmunosupresor) que requieren de aire purificado.

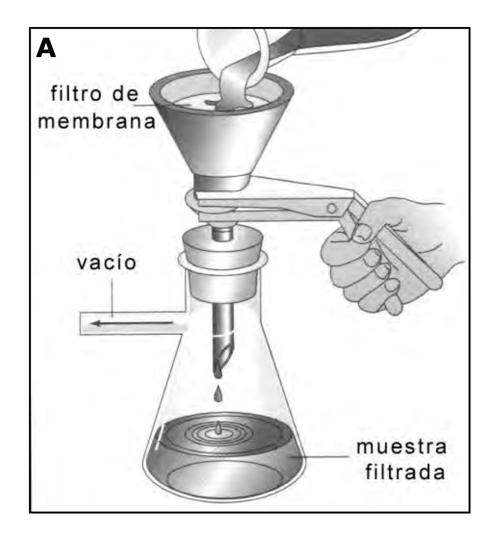




Figura 3.2.A) Equipo de filtración; **B)** Cabina de seguridad biológica

2.3. MÉTODOS QUÍMICOS

Agentes alquilantes

El requisito esencial para un agente químico esterilizante es que sea tóxico para los microorganismos, así como volátil de manera que pueda ser fácilmente eliminado del objeto esterilizado luego del tratamiento.

Normalmente se usa el formaldehído y el óxido de etileno, los cuales sustituyen los átomos lábiles de hidrógeno de los grupos $-NH_2$ (amino) y -OH (oxidrilo), presentes en proteínas y ácidos nucleicos y también de los grupos -COOH (carboxilo) y -SH (sulfhidrilo) de proteínas por grupos alquilos (reacción de alquilación).

Óxido de Etileno

El óxido de etileno (EtO) es un gas tóxico y explosivo, con alto poder de penetración y activo frente a bacterias, endosporas, virus y hongos. La esterilización se lleva a cabo en una cámara cerrada (muy parecida al autoclave) que controla la concentración de EtO, la temperatura y la humedad. Debido a que es un gas explosivo, generalmente se mezcla con CO_2 al 80 – 90%.

La concentración de EtO, la temperatura y la humedad influye sobre la velocidad de esterilización. Un objeto limpio se puede esterilizar por 5 – 8 horas a 38º C o 3 – 4 horas a 54º C cuando la humedad relativa se mantiene a 40 – 50% y la concentración de EtO a 700 mg/L. Es necesaria la aireación de todo el material esterilizado a fin de remover el EtO residual.

Es utilizado para la esterilización de materiales termolábiles, máquinas cardiopulmonares, oftalmoscopios, colchones, mantas, plásticos (placas de Petri, jeringas). Debido a su alto poder de penetración estos objetos se empaquetan primero y luego se esterilizan. El óxido de etileno actúa inactivando enzimas y otras proteínas con grupos sulfhidrilos (R-SH) reemplazando los átomos de hidrógeno por grupos alquilo.

Otros esterilizantes químicos gaseosos son el óxido de propileno y la β-propiolactona.

Formaldehído

Los vapores del formaldehído son tóxicos y con escaso poder de penetración. Sin embargo, posee acción bactericida, esporicida y viricida a una concentración menor de 3 mg/ml de aire, a valores de humedad relativa mayores del 60%. El procedimiento se realiza en el autoclave a 80º C durante 30 minutos, a una presión de 1/3 atmósfera. Es útil para la esterilización de textiles, plásticos y equipos termosensibles.

El formaldehído es una gas muy soluble en agua y comercializado como solución acuosa al 40% llamada formalina. Es uno de los mejores productos usados en la desinfección y esterilización hospitalaria, en la preparación de vacunas y toxoides y en la inactivación de virus y suspensiones bacterianas.

Peroxígenos (agentes oxidantes)

Los peróxidos ejercen su actividad antimicrobiana al oxidar los componentes celulares de los microorganismos tratados. Son ejemplos de agentes oxidantes el ozono, el peróxido de hidrógeno y el ácido peracético, aunque sólo al último se lo considera un esterilizante. Por lo general, es eficaz contra las endosporas y los virus en 30 minutos y destruye las formas vegetativas de las bacterias y a los hongos en menos de 5 minutos.

3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Medio de Cultivo

Es un complejo de sustancias que aportan nutrientes en concentraciones óptimas que permiten un buen desarrollo de los microorganismos.

Diseño de los medios de cultivo

La composición química de las células refleja cuáles son los principales materiales requeridos para el crecimiento. El agua representa entre el 80 y 90 % del peso total y es, así, el principal nutriente. La materia sólida de las células contiene hidrógeno y oxígeno (proveniente del agua), carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Estos seis elementos se conocen como **macronutrientes** ya que se requieren en altas concentraciones (en g/litro) y bajo una forma orgánica o inorgánica, según el microorganismo. Los elementos como el potasio, magnesio, calcio y hierro, deben proporcionarse en cantidades de mg/litro e incluirse como sales. Los requerimientos de manganeso, cobre, cobalto y zinc son muy pequeños y están presentes como contaminantes de los componentes principales y son conocidos como **elementos traza**.



Para diseñar un medio de cultivo adecuado debe considerarse:

- No incorporar nutrientes en exceso, mucho de los cuales resultarían inhibidores de crecimiento o tóxicos.
- Las actividades metabólicas de la población microbiana en crecimiento, llegarán a cambiar el medio ambiente hasta hacerlo muy desfavorable (acumulación de metabolitos orgánicos tóxicos, agotamiento del oxígeno, cambio de pH).

Los medios de cultivos se clasifican en:

Clasificación	Definición	Características
Según su origen	Comerciales	Se adquieren en forma deshidratada, se agrega agua, se mide el pH y se esteriliza.
	Preparados en el laboratorio	Son aquellos preparados en el laboratorio a partir de sus ingredientes básicos.
Según su consistencia	Líquidos	No presentan agentes solidificantes y permiten aumentar el número de microorganismos.
	Semisólidos	Presentan la característica de contener agar en baja concentración (0,2%). Se utilizan para conocer el comportamiento de los microorganismos frente al oxígeno y su movilidad.
	Sólidos	Son medios que tienen agar como agente solidificante (al 1-2%) y se utilizan con el objetivo de aislar un microorganismo.
Según su composición	Comunes	Son medios a los que no se adicionan sustancias que aporten factores de crecimiento y se utilizan para el aislamiento de microorganismos poco exigentes. Ejemplo: agar nutritivo.
	Sintéticos o definidos	Son medios en los que se conoce cuanti y cualitativamente cada uno de sus componentes.
	Complejos	Son medios en los que no se conoce cuanti y cualitativamente algunos de sus componentes, como extracto de levadura, peptona, hidrolizado de caseína, extracto de carne, etc. Ejemplo: Medio Manitol-Salado.
	Enriquecidos	Son medios a los que se le adicionan componentes como sangre, leche, yema de huevo, etc. Estos aportan factores de crecimiento (vitaminas, cofactores) que permiten el crecimiento de microorganismos exigentes desde el punto de vista nutricional. Ejemplo: Agar Sangre
	Naturales	Son medios preparados a partir de sustancias naturales. Ejemplo: agar papa, agar zanahoria.
Según su finalidad	Selectivos	Permiten el crecimiento de un microorganismo de interés en una muestra inhibiendo al resto, a través de la adición de diversas sustancias como cloruro de sodio, sales biliares, colorantes, etc., que actúan inhibiendo el crecimiento microbiano. Ejemplo: Medio Eosina-Azul de Metileno (EMB).
	Diferenciales	Permiten distinguir grupos de microrganismos poniendo en evidencia diferencias en la actividad metabólica a través de la incorporación de distintas sustancias, principalmente azúcares. Ejemplo: Medio Eosina-Azul de Metileno (EMB).
	De Enriquecimiento	Permiten la multiplicación de los microorganismos de interés desfavoreciendo la microbiota acompañante.

Preparación de Medios de Cultivo

- La preparación del material de vidrio en el laboratorio microbiológico es de fundamental importancia. Se lava con detergente y se enjuaga con agua corriente varias veces y agua destilada para eliminar todo residuo de sustancia orgánica o inorgánica. El recipiente destinado a la preparación de medios debe ser suficientemente grande para permitir una adecuada homogeneización del medio de cultivo (no agregar agua más allá de 2/3 de su capacidad).
- En el caso de medios comerciales, se pesa el medio deshidratado y se agrega aproximadamente la mitad de la cantidad de agua necesaria, se agita para lograr una suspensión homogénea y se añade el agua restante. En los medios preparados a partir

de sus constituyentes básicos, se debe lograr la disolución completa de cada uno de ellos con agua destilada, antes de incorporar el siguiente componente.

- Cuando se requieren cantidades trazas de un nutriente puede ser necesario la preparación de soluciones concentradas y posterior adición de un volumen adecuado de dicha solución al medio de cultivo.
- Los medios de cultivo sólidos poseen agar como agente solidificante. Su disolución completa se realiza a baño de María y se visualiza cuando al agitar el medio no se adhiere ninguna partícula a la pared interna del recipiente y la solución viscosa es homogénea. El agar de buena calidad no altera el pH del medio. Debe incorporarse después de los demás constituyentes, una vez medido el pH.
- En la preparación de los medios de cultivo debe considerarse que ciertos cationes (calcio y hierro) forman complejos insolubles con los fosfatos dificultando la observación o cuantificación del desarrollo microbiano. Este fenómeno se evita con la preparación y esterilización de las soluciones concentradas de las sales de hierro y calcio y su posterior adición al medio esterilizado y enfriado.
- El pH del medio desciende después de la esterilización por autoclave. Este descenso depende de la composición del medio, de la temperatura del medio en el momento de la medición y del tratamiento del medio de cultivo durante su preparación (disolución, esterilización). Es recomendable el uso de un aparato medidor de pH (peachímetro) o de cintas indicadoras de pH. La corrección del pH se logra por adición al medio de cultivo de un volumen conocido de una solución de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 1 N o 0,1 N.
- El fraccionamiento del medio debe realizarse tan pronto como sea posible.

Fuentes de error en la preparación de medios de cultivo

Las posibles fuentes de error son:

- Selección inadecuada del medio de cultivo o uso inapropiado.
- Adición de un volumen incorrecto de agua o utilización de agua corriente con impurezas.
- Adición de menor cantidad de agar al medio, lo cual se manifiesta por la no solidificación correcta del mismo.
- Utilización de balanzas inadecuadas cuyo margen de error altera la composición del medio.
- Distribución errónea del volumen del medio que puede resultar inapropiado para su utilización.
- Disolución insuficiente del agar. Al distribuir el medio agarizado en recipientes (tubos) dan como resultado tubos con medio que no logran solidificar.
- La esterilización a temperaturas elevadas y/o durante períodos de tiempo largos, puede ocasionar el deterioro de algunos constituyentes.
- Los residuos adheridos al vidrio pueden inhibir algunos microorganismos exigentes particularmente a los virus.

4. Bibliografía

Collins CH, Lyne PM (2001). Métodos Microbiológicos. Editorial Acribia, S.A. - 5º Ed. y anteriores, Zaragoza, España.

De Robertis, de Robertis (h) (2000). Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009). Control del crecimiento microbiano. En: ***Brock Biología de los microorganismos***. 12º Edición. Editorial Pearson Educación, S.A., pág. 866–873.

Prats G. (2008). Técnicas y medios de cultivo. En: ***Microbiología clínica***. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pág. 24-29.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2002). Control of microorganisms by physical and chemical agents. In: ***Microbiology***. Editorial McGraw Hill, United States.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2007). Control del crecimiento microbiano. En: **Introducción a la Microbiología.** 9º Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pág. 187-198.

TEÓRICO PRÁCTICO 3.
ESTERILIZACIÓN y PREPARACIÓN de MEDIOS de CULTIVO

Problema 1

Ud. dispone en su laboratorio de un mechero, autoclave, una solución de etanol al 70%, una estufa de esterilización y una lámpara de luz UV y, necesita preparar y/o esterilizar los siguientes materiales:

a) agar nutritivo,

b) granos de maíz,

c) agar MYPA (Agar Manitol Yema de Huevo Polimixina) con polimixina B,

d) caldo nutritivo conteniendo una suspensión de aproximadamente $3x10^9$ cél/ml de *Bacillus cereus*,

e) una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm, placas de Petri de vidrio, ansa, pipetas de vidrio y la estufa de cultivo

1) Indique qué método(s) de esterilización y/o desinfección de los que dispone en su laboratorio utilizaría para cada uno de los materiales mencionados. Especifique cuál es el modo de acción de cada método elegido.

2) ¿Qué características del material o sustancia deben tenerse en cuenta para la elección del método de esterilización?

3) ¿Necesita disponer de algún otro método de esterilización? ¿Por qué? Si la respuesta anterior es afirmativa, indique qué método(s) de esterilización y/o desinfección utilizaría para cada uno de los materiales mencionados y especifique cuál es el modo de acción de cada método elegido.

Luego de esterilizar los diferentes medios de cultivo, los incuba a 37°C durante 72 h para controlar su esterilización. Al cabo de dicho tiempo detecta crecimiento de microorganismos:

4) ¿Qué parámetros debería controlar para que el proceso de esterilización se lleve a cabo de manera adecuada? Explique

5) Una vez solucionado el inconveniente ¿Cómo determinaría si dicho medio está efectivamente estéril?

Problema 2

Ud. está trabajando en un proyecto de investigación y uno de los objetivos del mismos es: evaluar la termorresistencia de una cepa de *Bacillus cereus*, mediante la elaboración de una curva de muerte térmica en caldo cerebro corazón (BHI) y en conservas de tomate. ¿Cómo demostraría en forma práctica cuál es el tiempo de reducción decimal de dicho microorganismo en ambas muestras? (Ayuda: elija distintas temperaturas y diferentes tiempos). ¿Habría diferencias en el valor del tiempo de reducción decimal si trabaja con el cultivo puro o con la conserva? Fundamente su respuesta.

Problema 3

a) ¿Qué tienen en común desde el punto de vista tecnológico el vino, la leche y la cerveza? b) ¿Qué diferencia existe entre las denominadas "leches larga vida" y las convencionales? c) ¿Por qué cree Ud. que las "leches larga vida" no necesitan refrigeración y se conservan cerradas por más de 2 meses? ¿Por qué cree Ud. que una vez abierto el envase se deben consumir dentro de los 3 días? ¿Por qué están adicionadas con vitaminas A y D?

LABORATORIO 2.
ESTERILIZACIÓN y PREPARACIÓN de MEDIOS de CULTIVO

OBJETIVOS

- Preparar y esterilizar material de uso común en el laboratorio microbiológico.
- Aprender el manejo de aparatos más comúnmente utilizados en el laboratorio de microbiología.
- Diseñar, elaborar y esterilizar medios de cultivo.

DESARROLLO PRÁCTICO

Primer día:

a) **Preparación de material para esterilizar y elección del método de esterilización adecuado.** Complete la siguiente tabla:

MATERIAL	METODO	CONDICIONES
Antibióticos (en solución y sólido)		
Caja de cirugía		
Equipo de filtración (presión positiva y negativa)		
Filtros esterilizantes		
Glicerol al 15%		
Granos de cereales		
Guantes de goma		
Jeringas de plástico		
Jeringas de vidrio		
Microtubos (tipo tubos Eppendorff)		
Pipetas en pipeteros		
Pipetas envueltas en papel		
Placas de Petri (de vidrio y plásticas)		
Puntas para micropipetas		
Solución de azúcar al 40%		
Tapones de goma		
Tierra		
Vaselina		
Vitaminas (en solución y sólida)		

b) Aprendizaje del manejo y cuidado de aparatos más comúnmente utilizados en un laboratorio microbiológico.

- Heladeras (2 a 4°C y congeladores hasta −80°C).
- Cabina de flujo laminar y cabina de seguridad biológica.
- Autoclave.
- Estufas de incubación (28 – 37° C) y estufas de esterilización.
- Homogeneizador de muestras.
- Centrífugas y ultracentrífugas.
- Balanzas de diferente precisión (0,1 g, 0,001g), analíticas y digitales.
- pH-metros.
- Microscopios de campo brillante.
- Liofilizador.

c) Preparación de medios de cultivo:

Cada subgrupo preparará diferentes medios de cultivos: *agar nutritivo, agar manitol salado, agar cetrimide, Agar eosina-azul de metileno (EMB).*

Consideraciones generales:

- Leer atentamente la fórmula de los medios y calcular la cantidad de cada uno de los componentes químicos.
- Pesar en balanza digital sobre papel aluminio.
- Colocar los componentes en un frasco Erlenmeyer de volumen adecuado y agregar el agua destilada.
- Medir el pH.
- Agregar agar en caso de los medios sólidos.
- Acondicionar para su esterilización en el autoclave.
- Conservar en heladera a 4º C hasta su fraccionamiento.

AGAR NUTRITIVO

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.3	

Parte del medio de cultivo se esterilizará por autoclave para luego ser fraccionado en placas de Petri estériles y parte, se disolverá por calentamiento a baño de María, se distribuirá en tubos y se esterilizarán por autoclave. Luego del proceso de esterilización, los tubos se inclinarán a fin de obtener tubos en "agar pico de flauta" y tubos con "agar inclinado".

MEDIO DE MANITOL SALADO (medio de Chapman)

Extracto de carne	1 g
Polipeptona	10 g
ClNa	75 g
Manitol	10 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio es altamente selectivo para el aislamiento y diferenciación de especies del género *Staphylococcus* que son patógenas y pone de manifiesto la habilidad de *S. aureus* de fermentar el manitol. Es **selectivo** debido a la concentración de ClNa (7,5%, aproximadamente 10 veces más que un medio común), esta concentración elevada de sal inhibe la mayoría de los microorganismos que no pertenecen al género *Staphylococcus*. El agregado de manitol lo hace al medio **diferencia**l, la utilización de éste azúcar determina la producción de ácido dando como resultado colonias opacas rodeadas de una zona amarilla como consecuencia del viraje del indicador (rojo fenol) de rosa al color amarillo. Esta característica se manifiesta cuando en el medio se desarrolla la especie patógena *S. aureus*. Cuando no se produce la utilización de éste azúcar se produce la alcalinización del medio, con viraje del indicador de rosa a fucsia. Esta reacción es característica de la especie no patógena *S. epidermidis*

MEDIO EMB (medio de Levine)

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato dipotásico	2 g
Eosina	0,4 g
Azul de Metileno	0,065 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.3	

Es un medio selectivo y diferencial recomendado para el aislamiento de bacilos Gram (-) entéricos. El azul de metileno y la eosina inhiben a las bacterias Gram (+) y Gram (-) exigentes, esta característica lo hace **selectivo**. El agregado de lactosa lo hace **diferencial**, las bacterias entéricas producen un descenso de pH que da como resultado colonias rojas (lac+). El descenso de pH producido por *E. coli* hace que se forme una unión amida entre la eosina y el azul de metileno dando como resultado colonias con brillo metálico (lac +).

AGAR CETRIMIDE

Peptona de gelatina	20 g
SO_4K_2	10 g
Cl_2Mg	1,4 g
Cetrimide	0,3 g
Agar	13,6 g
Agua destilada	1000 ml
Aditivo: glicerina	10 ml

Es un medio **selectivo** para aislamiento de especies de *Pseudomonas* a partir de diversos materiales. Posee en su composición Cetrimide (Bromuro de cetiltrimetil amonio) un detergente que provoca una notable inhibición de toda biota acompañante. En este medio también se pone de manifiesto la producción de pigmentos por algunas especies, tales como, *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo día

a) Fraccionamiento de los medios de cultivos en placa

Una vez esterilizados los diferentes medios de cultivos y antes que solidifiquen se vierten en placas estériles (10 – 20 ml) en cabina de seguridad biológica. Una vez solidificado, se llevan las placas a la estufa de 37º C unos minutos, colocándolas invertidas y destapadas para que se evapore el agua de condensación. Luego se tapan y están listas para ser usadas. Si no se usan en el momento deben ser conservadas a 4º C.

b) Fraccionamiento del agar nutritivo en tubos

Se coloca el agar nutritivo fundido en tubos (1/3 del volumen), se esterilizan y luego se dejan solidificar: a) en forma vertical para obtener agar en columna; b) con una mayor inclinación para agar inclinado; c) y con una menor inclinación para obtener el agar pico de flauta.

c) Discusión teórica de los criterios a tener en cuenta para la selección de un método de esterilización adecuado.

TRATAMIENTO DE LOS MATERIALES USADOS

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

CAPITULO IV.
MÉTODOS DE SIEMBRA Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

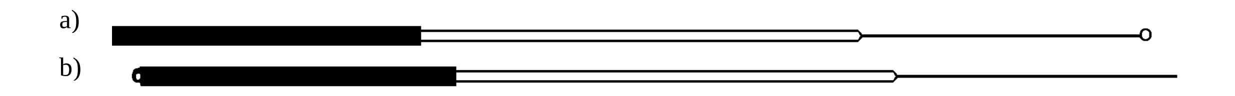
1. Introducción

La técnica más usada en el laboratorio de microbiología es probablemente la transferencia de microorganismos de un ambiente a otro con el propósito de cultivarlos. Una vez que el medio de cultivo está debidamente preparado se procede a inocular la muestra deseada.

Si se desea aislar o separar los diferentes tipos microbianos que se encuentran en una muestra (agua, materias primas, alimentos, etc.) se pueden utilizar distintas técnicas de siembra. Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de la muestra (inóculo) en un medio de cultivo adecuado con el fin de iniciar un cultivo microbiano; y se realizan diferentes metodologías de acuerdo al fin que se persiga. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

Dependiendo del estado físico del medio de cultivo (líquido, sólido o semisólido) la siembra se puede realizar con: ansa en anillo, ansa en punta, varilla de vidrio (espátula de Drigalsky), hisopo o pipeta estéril.

El **ansa de siembra** consta de un filamento de platino, que puede ser recto o en anillo. Para facilitar el manejo, este filamento está sujeto a un mango aislante.



a) ansa en anillo
b) ansa recta

Antes de poner en contacto el ansa de siembra con los microorganismos. Esta debe ser esterilizada para evitar contaminaciones; para ello se la incinera a la llama del mechero Bunsen, hasta que todo el filamento esté incandescente. Se deja enfriar el ansa cerca de la llama y luego, se la introduce en el recipiente (tubo, placa, frasco Erlenmeyer, etc.) que contenga el cultivo microbiano o la muestra que se quiere trasladar.

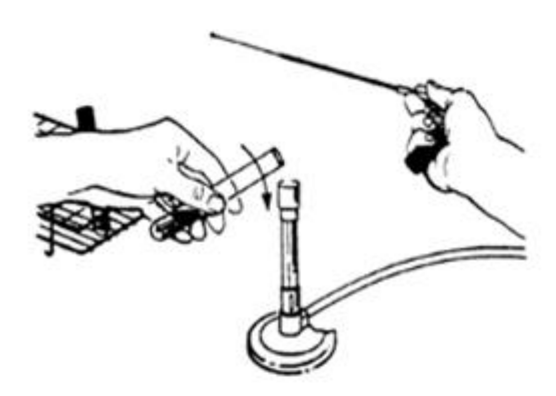
Para ello, se sigue el siguiente esquema:



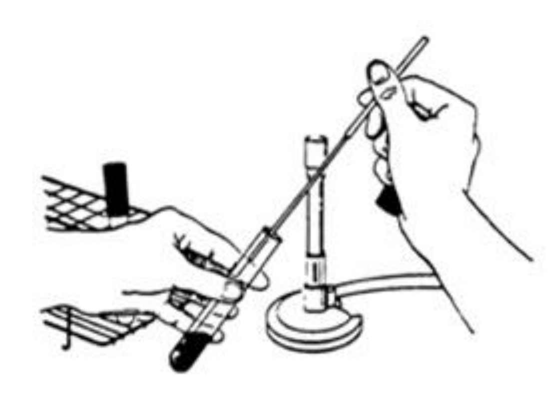
Flamear el ansa de siembra en la llama del mechero



Sujetar el tapón del tupo con los dedos anular y meñique y abrir el tubo



Flamear la baca del tubo en la llama del mechero



Introducir el ansa en el interior del tubo y proceder a sembrar



SIEMBRA EN ESTRÍAS



SIEMBRA EN PICADURA

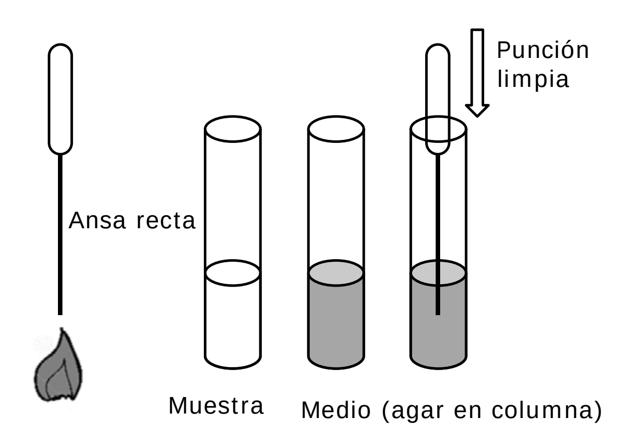
Fuente: Prácticas de Microbiología Industrial. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia.

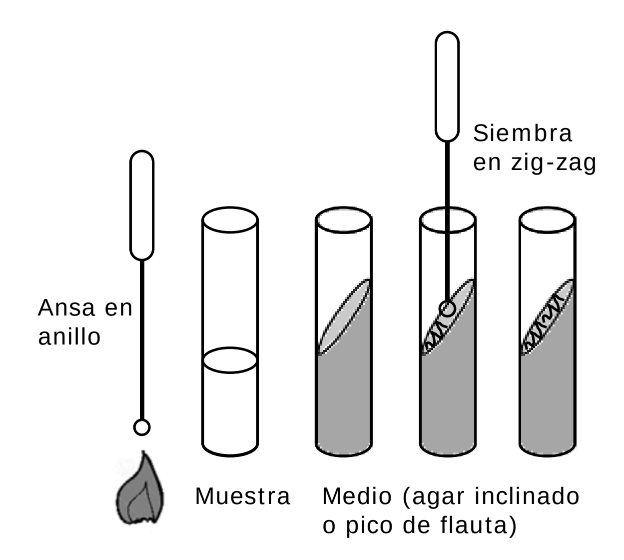
2. CULTIVOS EN MEDIOS SÓLIDOS

Siembra en picadura o punción

Se introduce el ansa en punta con el inóculo en un tubo conteniendo agar en columna, sin tocar las paredes del tubo y en forma paralela asegurándose que el inóculo quede distribuido a lo largo de toda la punción. Se retira el ansa y se quema.

Esta técnica permite conocer el comportamiento de los microorganismos frente al oxígeno y su movilidad.





Siembra en estrías

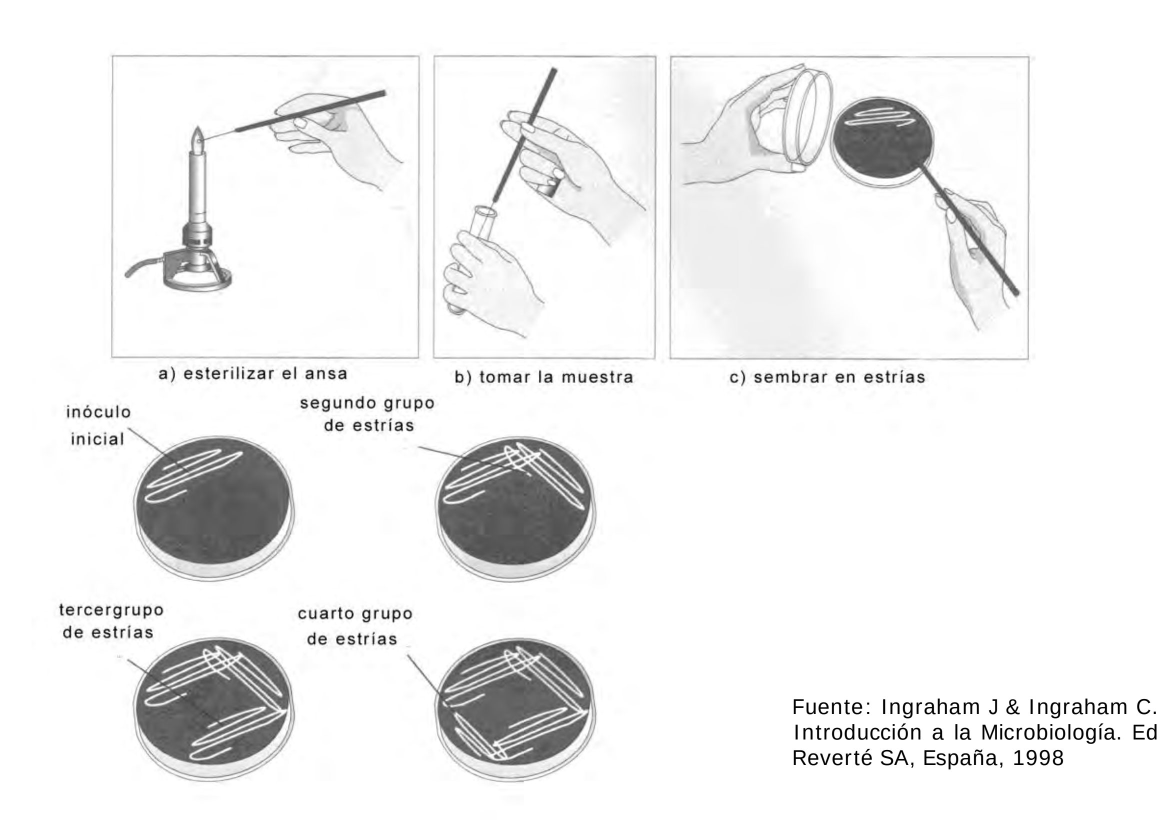
Se toma el material con ansa en anillo y se siembra en estrías en un tubo que contiene agar pico de flauta o agar inclinado, respetando las indicaciones señaladas anteriormente.

Esta técnica constituye un medio adecuado para el cultivo de microorganismos aerobios y aerobios facultativos.

Siembra por agotamiento en estrías

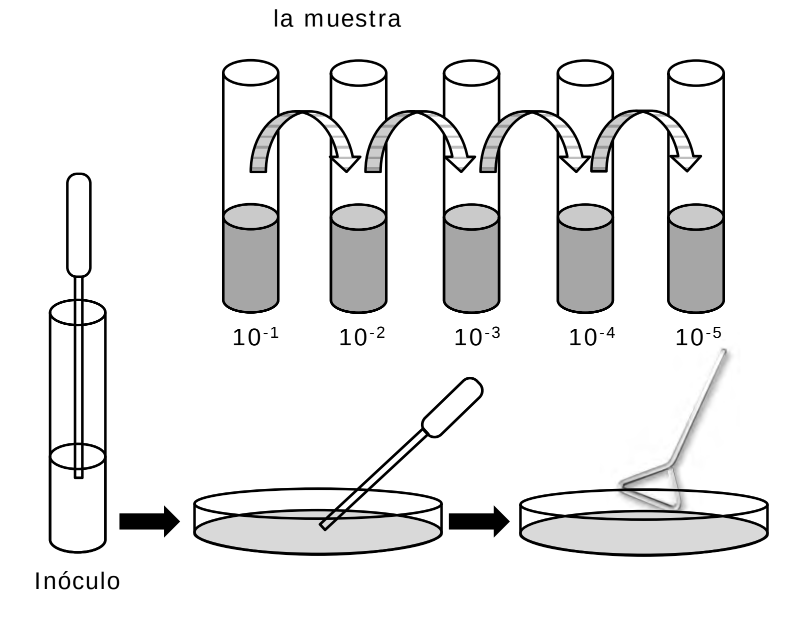
Con el ansa en anillo cargada de material se realiza una serie de estrías paralelas no superpuestas, sobre una tercera parte de la superficie de la placa de Petri conteniendo el medio de cultivo. Se esteriliza el ansa y se efectúan una serie de estrías en dirección perpendicular a la anterior, comenzando en la zona donde termina la última estría. Este procedimiento se repite varias veces.

El esterilizar el ansa de siembra disminuye la cantidad de microorganismos que se extiende en una superficie determinada. Una vez inoculadas las placas se incuban en estufa durante 24 – 48 h, a la temperatura adecuada según el microorganismo a cultivar. Utilizando esta metodología de siembra se obtienen **colonias aisladas** en las últimas estrías, separadas unas de otras, permitiendo a partir de las mismas la obtención de cultivos puros mediante resiembra en otro medio de cultivo.



Fuente: Ingraham J & Ingraham C. Introducción a la Microbiología. Ed Reverté SA, España, 1998

Siembra con espátula de Drigalsky



Se pipetea un volumen de inóculo (generalmente 0,1 ml) y se deposita sobre la superficie de la placa de Petri que contiene el medio de cultivo solidificado. Con una espátula de Drigalsky estéril (previamente embebida en alcohol, flameada y enfriada) se disemina la muestra por toda la superficie, efectuando movimientos de rotación hasta su completa absorción.

Esta técnica permite sembrar inóculos sobre superficies grandes, para obtener un crecimiento confluente que nos permite estudiar el efecto de antimicrobianos (antibióticos, antisépticos, desinfectantes, etc.). También se utiliza para realizar recuento de colonias; para cumplir con este último objetivo, previamente se deben realizar diluciones seriadas de la muestra.

Siembra con hisopo

Se embebe un hisopo de algodón estéril en un tubo que contiene un cultivo líquido previamente homogeneizado. Se elimina el exceso de inóculo presionando el hisopo contra las paredes internas del tubo y se disemina el inóculo por toda la superficie de la placa conteniendo el medio de cultivo sólido.

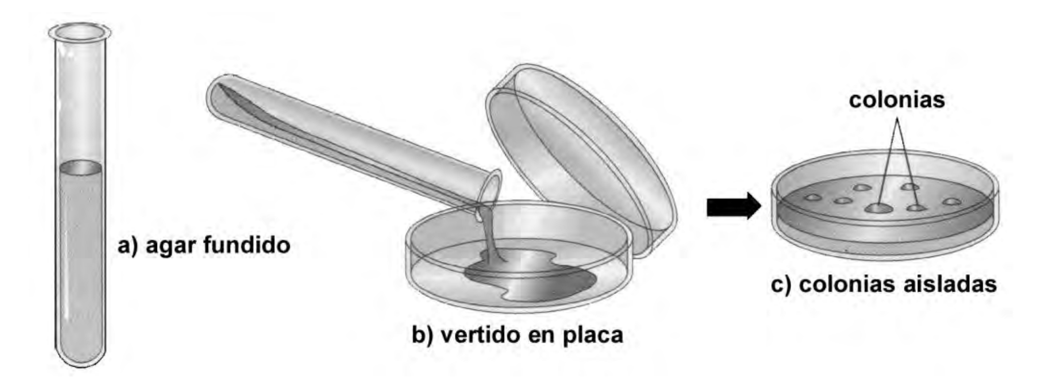
Esta técnica permite sembrar inóculos abundantes sobre superficies grandes (cajas de Petri, botellas de Roux, etc.) a los fines de obtener un crecimiento confluente con los mismos fines

que en el procedimiento anterior, excepto que no se pueden realizar recuento de colonias debido a que no se conoce el volumen de inóculo que se siembra.

Siembra en placa vertida

Se lleva un volumen de inóculo (generalmente 1 ml) a un tubo que contiene agar fundido y se vierte el contenido en una placa de Petri vacía y estéril. Se homogeneiza el contenido de la placa efectuando movimientos rotatorios en ambas direcciones para distribuir su contenido y se deja solidificar.

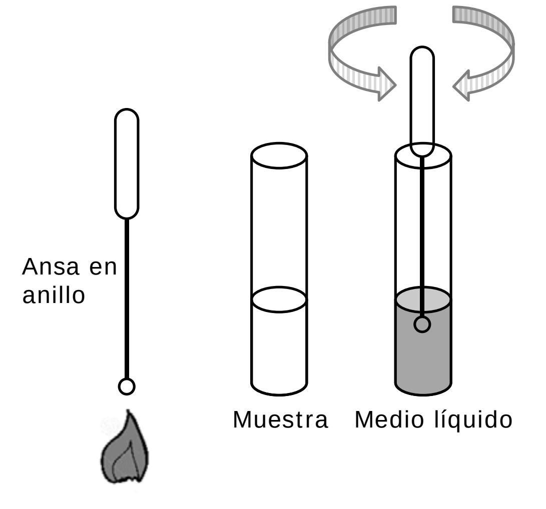
Una vez incubada a la temperatura adecuada, se observarán colonias en profundidad (inmersas en el medio) y en la superficie. Esta técnica permite el desarrollo de microorganismos aerobios, aerobios facultativos y microaerófilos.



Fuente: Ingraham J & Ingraham C. Introducción a la Microbiología. Ed Reverté SA, España, 1998

3. CULTIVOS EN MEDIOS LÍQUIDOS

Se lleva el material con ansa en anillo o pipeta a un recipiente (frasco Erlenmeyer o tubo) conteniendo el medio de cultivo líquido. Generalmente este tipo de siembra se utiliza para aumentar el número de microorganismos.



4. INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE FÍSICO

1. Introducción

Las actividades microbianas se ven afectadas por las condiciones físico-químicas del ambiente. El entendimiento de la influencia medioambiental sobre los microorganismos permite explicar su distribución ecológica y a diseñar métodos para su control y/o destrucción. No todos los organismos responden igualmente a un factor ambiental determinado. De hecho, una condición ambiental puede ser dañina para un organismo y beneficiosa para otro.

Los factores físicos que influyen sobre el crecimiento de los microorganismos son: temperatura, pH, oxígeno, disponibilidad de agua, presión osmótica y radiaciones.

2. Temperatura

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la proliferación y sobrevida de los organismos. Los microorganismos son particularmente susceptibles debido a que son usualmente unicelulares y "poikilotérmicos", es decir que su temperatura varía de acuerdo a la del medioambiente externo. Ciertas bacterias pueden desarrollarse a temperaturas extremas que impedirían la supervivencia de casi todos los organismos eucariotas.

El factor más importante que influencia la temperatura sobre el crecimiento microbiano es la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Así, dentro de ciertos límites, las reacciones químicas y enzimáticas en la célula ocurren a velocidades cada vez más rápidas conforme aumenta la temperatura.

La dependencia de la temperatura de un microorganismo se caracteriza por sus **temperaturas cardinales** (temperaturas de crecimiento mínima, óptima y máxima). Al sobrepasar la temperatura máxima se produce la desnaturalización irreversible de las proteínas estructurales y enzimáticas. Por debajo de la temperatura mínima los microorganismos detienen su crecimiento pero mantienen su viabilidad. Estas características del crecimiento tienen importantes aplicaciones prácticas. Las temperaturas por encima de la máxima son utilizadas para eliminar microorganismos mediante los procedimientos de esterilización por calor, mientras que la congelación es usada para la conservación de cultivos, sangre, plasma, alimentos, cepas bacterianas. La temperatura óptima permite, entre otros factores, la máxima velocidad de desarrollo microbiano.

De acuerdo a sus temperaturas cardinales, los microorganismos pueden ser clasificados en cinco categorías (Figura 4.1). Los límites y las temperaturas máximas que definen a las bacterias en estos cinco grupos no están bien definidos, dado que existen variaciones para cada especie en particular**.**

Psicrófilos	Pueden crecer a 0º C, pero tienen una temperatura óptima de crecimiento de aproximadamente 15º C. Estos microorganismos rara vez causan problemas en la conservación de los alimentos.
Psicrótrofos (psicrófilos facultativos)	Pueden proliferar a 0º C, pero tienen temperaturas óptimas de crecimiento más elevadas (20 a 30º C). Son más comunes que los psicrófilos y probablemente están implicados en el deterioro de los alimentos a bajas temperaturas.
Mesófilos	Presentan una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 40º C. Son el tipo más común de microorganismos y comprenden a microorganismos que causan deterioro en los alimentos y enfermedades en el hombre y animales
Termófilos	Muchos de ellos tienen una temperatura óptima de 50 a 60º C y varios de ellos no pueden desarrollar a temperaturas inferiores a los 45º C. No constituyen un problema en salud pública y son importantes en los montículos de compost
Hipertermófilos	En ocasiones son llamados termófilos extremos. Tienen una temperatura óptima de crecimiento de 80º C o más, viven en fuentes termales asociadas a la actividad volcánica.

Figura 4.1. Clasificación de los microorganismos según sus temperaturas cardinales

3. Acidez y alcalinidad (pH)

La concentración de iones positivos juega un rol decisivo en la colonización de sustratos de diferentes ambientes. La mayoría de los entornos naturales poseen valores de pH entre 5 y 9, evidentemente el mayor número de poblaciones microbianas desarrollarán dentro de estos límites. En general, las bacterias desarrollan a pH neutro (7,2 - 7,6), cuando el pH disminuye por debajo de 5, el crecimiento bacteriano es progresivamente menor.

Respecto del margen normal de pH a los que crecen los microorganismos, se clasifican en:

Acidófilos	•Crecen entre pH 0 y pH 5 •**Acidófilos extremos u obligados**) Algunas eubacterias del género *Thiobacillus (T. thiooxidans, T. ferrooxidans)* y las arqueas del género *Sulfolobus* tienen su pH óptimo cercano a 2. De hecho, estas bacterias necesitan esas altas concentraciones de H^+ para mantener la integridad de sus membranas y envolturas.
Neutrófilos	•Crecen entre pH 5 y pH 9 •Ejemplos: la mayoría de las bacterias (*E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. etc.)
Basófilos	•Crecen entre pH 8,5 y pH 11,5 •**Basófilas obligadas** tienen óptimos de pH en torno a 10-11. Ejemplo, *Bacillus alcalophilus*, cuyo pH interno es de 9. Sus hábitats típicos son suelos carbonatados y lagunas alcalinas (algunos son también halófilos, como *Natronobacterim gregoryi*

Muchas bacterias neutrófilas modifican el pH del medio y resisten entornos relativamente ácidos o alcalinos. Por ejemplo, algunas bacterias fermentativas excretan ácidos, mientras otras alcalinizan el medio, produciendo amonio a partir de desaminación de aminoácidos.

Para evitar cambios en el pH del medio de cultivo que puedan afectar el desarrollo de un microorganismo, con frecuencia se añade un amortiguador (buffers) o bien, carbonatos insolubles. Los amortiguadores a base de fosfatos, son mezclas de fosfatos monobásicos (PO_4H_2K) y dibásicos (PO_4HK_2) que en distintas proporciones pueden controlar y mantener el pH entre valores de 6,0 y 7,6 aproximadamente. Los carbonatos insolubles como carbonato de calcio (CO_3Ca), a pH por debajo de 7,0 se descomponen con liberación de CO_2 actuando como agentes neutralizantes. Se encuentran mayores dificultades cuando se trata de controlar el pH alcalino, debido a que los amortiguadores de fosfato no son efectivos en la escala de pH entre 7,2 y 8,5. Por tanto, en ciertos casos es necesario ajustar el pH, en forma periódica mediante la adición aséptica de ácidos o bases fuertes.

El desarrollo de una población microbiana puede ser inhibido por:

- el descenso de pH debido a la producción de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de los azúcares.
- el ascenso de pH resultante de la utilización de componentes aniónicos o la descomposición de proteínas y aminoácidos.

4. Oxígeno

El comportamiento de cada microorganismo frente al oxígeno está dado por la presencia o no de una o más enzimas, tales como: catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa (SOD), encargadas de destruir los derivados tóxicos del oxígeno: peróxido (H_2O_2), anión peróxido

(O^{2-}_2), oxígeno singlete ($^1O^-_2$), radicales libres superóxido (O^-_2) y radical hidroxilo (OH^-). Esto determina la concentración gaseosa que debe suministrarse durante el crecimiento microbiano.

Los microorganismos pueden clasificar en:

MICROORGANISMOS AEROBIOS:

Aerobios estrictos u obligados	•Dependen de la respiración aeróbica para cubrir sus necesidades energéticas. •Crecen fácilmente sobre la superficie de placas de agar y en la superficie de los cultivos líquidos en reposo (estáticos). •En cultivos líquidos, es necesario airear el cultivo para suministrar la misma concentración de O_2 en todo el cultivo. •Poseen las enzimas catalasa, peroxidasa y superoxidismutasa (SOD) para neutralizar las formas tóxicas del O_2. •Ejemplos: *Micrococcus luteus, Pseudomonas* spp.
Microaerófilos	•Son microorganismos aerobios que crecen mejor a presiones parciales de O_2 considerablemente más bajas (0,2 atm) que las presentes en el aire •En medios de cultivo no crecen en la superficie, sino por debajo donde la concentración de O_2 es menor. •Poseen las enzimas catalasa, peroxidasa y SOD para neutralizar las formas tóxicas del O_2. •Ejemplos: *Campilobacter* spp., *Spirillum volutans.*
Aerobios facultativos	•Pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de O2, pero lo hacen mejor en presencia, en cuyo caso realizan respiración aeróbica. •En medios sin O_2 desarrollan mediante respiración anaeróbica o fermentación. •En los medios de cultivo pueden desarrollar en todo el tubo, tanto en superficie como en profundidad. •Poseen las enzimas catalasa, peroxidasa y SOD para neutralizar las formas tóxicas del O_2. •Ejemplo: *Escherichia coli.*

MICROORGANISMOS ANAEROBIOS:

Aerotolerantes	•No requieren ni crecen en presencia de oxígeno y toleran su presencia. •Poseen SOD o un sistema equivalente que les permite neutralizar las formas tóxicas del O_2. •Ejemplo: *Enterococcus faecalis, Streptococcus pyogenes.*
Anaerobios estrictos	•Se desarrollan en ausencia de O_2. •Realizan respiración anaeróbica o fermentación. •Los cultivos líquidos se preparan en tubos o matraces con gran volumen de medio con el agregado de sustancias reductoras, cerrados con tapones de goma o rosca, eliminando el O_2 por ebullición del medio de cultivo, previo a la siembra. •El aislamiento en medios sólidos se realiza mediante la incubación de las cajas de Petri en jarras anaeróbicas de cierre hermético. •Carecen de enzimas para neutralizar las formas tóxicas del O_2. •Ejemplo: *Bacteroides, Fusobacterium, Clostridium.*

5. Disponibilidad de agua

La disponibilidad de agua depende no sólo del contenido de agua del ambiente, es decir cuán húmedo o seco sea un hábitat determinado, sino también de la concentración de solutos en ella. Esto es porque las sustancias disueltas tienen gran afinidad por el agua, lo que hace que el agua asociada con los solutos sea inutilizable por los organismos.

Los efectos de altas concentraciones de solutos sobre los microorganismos se deben al soluto en sí mismo o a los efectos del soluto sobre la actividad acuosa (a_W). Los solutos disueltos en agua disminuyen la cantidad de agua libre. La actividad acuosa provee una medida del agua disponible para el microorganismo

La disponibilidad del agua se expresa en términos físicos como la **actividad de agua (a_W)**. Esta es el cociente entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia o solución y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura y se define por la siguiente ecuación:

$$a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

donde:

P = presión de vapor a saturación en la solución.

P_0 = presión de vapor a saturación del agua pura bajo las mismas condiciones.

n_1 = número de moles del soluto.

n_2 = número de moles del solvente.

A medida que se incrementa la concentración de soluto decrece la actividad acuosa. Los valores de a_W varían entre 0 y 1. La a_W del agua pura es 1.

En muchas situaciones prácticas la a_W es el factor ambiental dominante que gobierna la estabilidad o el deterioro de un alimento.

En la escala de la a_W la vida existe en el rango de 0,999 a 0,60. La mayoría de los microorganismos toleran pequeños decrecimientos de a_W; no crecen por debajo de 0,95. Sin embargo, hay notables excepciones, estas incluyen a bacterias halófilas, levaduras osmófilas y hongos xerófilicos. Dichos microorganismos son agentes de deterioro en productos alimenticios.

Exceptuando los micoplasmas, que carecen de pared celular, las bacterias pueden vivir en medios hipotónicos, debido a la protección que les brinda la pared celular rígida

Normalmente el citoplasma de las bacterias poseen una osmolaridad ligeramente superior a la del entorno, lo que garantiza el paso de agua al interior. La presión de turgencia es relativamente constante porque la membrana citoplásmica se topa con la rigidez de la pared celular.

a) En medios hipotónicos (cuando la a_w en el exterior $>a_w$ que la del citoplasma) es la pared celular la que ejerce todo el papel: su rigidez se opone a la entrada de agua, y por lo tanto, evita que la membrana citoplásmica tienda a sufrir una presión de turgencia excesiva.

b) En medios hipertónicos (cuando la a_w del exterior < que la del citoplasma). Algunas bacterias poseen mecanismos compensatorios por los que tienden a aumentar la osmolaridad interior por encima de la del medio (para garantizar la entrada de agua del ambiente y mantener su metabolismo). Ello se logra esencialmente aumentando la concentración de un soluto muy soluble en agua en el interior celular (denominado **soluto compatible)**, lo cual se puede lograr por varios mecanismos posibles:

- bombeando iones al interior;
- sintetizando una molécula orgánica osmóticamente activa;

– bombeando sustancias osmoprotectoras.

Ahora bien, si el medio es muy hipertónico, estos mecanismos son incapaces de evitar la salida de agua desde el citoplasma, lo cual conlleva a una retracción de la membrana citoplasmática. La pérdida de agua puede suponer la deshidratación del citoplasma, lo que conlleva a la detención del crecimiento.

Existen ciertos microorganismos especializados que viven en medios hipertónicos, y en general se llaman **osmófilos**. Entre los osmófilos podemos distinguir los sacarófilos y los halófilos.

Uno de los ejemplos de microorganismos **sacarófilos** son las levaduras, que viven en jugos de vegetales, néctares, zumos etc., con contenido alto de glucosa y/o sacarosa. Las levaduras utilizan como solutos compatibles polioles como el sorbitol, el ribitol, etc.

Entre los organismos **halófilos**, podemos distinguir los halófilos moderados y los halófilos extremos o hiperhalófilos:

Halófilos moderados (facultativos): suelen ser bacterias marinas que viven en 3,5% de NaCl, y que generalmente ven inhibido su crecimiento a concentraciones mayores o menores de sales. Los halófilos moderados tienen requerimientos concretos de una a_w equivalente a la de agua de mar, así como concentraciones determinadas de iones Na^+.

Halófilos extremos (hiperhalófilos o estrictos), representados paradigmáticamente por las arqueas de la familia *Halobacteriaceae* (halobacterias), que viven en (y de hecho *requieren*) concentraciones saturantes de sales (salitrales, lagunas salinas). Estos microorganismos requieren cerca de 30% de sales para su desarrollo en el laboratorio.

Además de las bacterias halófilas, que requieren altas concentraciones de sales para su desarrollo, hay algunas bacterias que pueden tolerar cierta concentración de sales, y se denominan **halotolerantes** (como por ejemplo, *S. aureus*).

La inmensa mayoría de los procariotas viven a valores de actividad de agua de 0,98. Por ello, un método que ya se conocía empíricamente en la antigüedad para conservar ciertos alimentos era desecarlos o salarlos, o añadirles grandes cantidades de azúcar (como en las mermeladas). Estas estrategias para conservar los alimentos tienen como base los principios antes expuestos.

6. Radiaciones no Ionizantes

Luz Ultravioleta (UV)

La luz ultravioleta es de considerable interés microbiológico por su efecto sobre las macromoléculas celulares. Las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos absorben a una longitud de onda de 260 nm, mientras los aminoácidos (triptofanos, fenilalanina, tirosina) lo hacen a 280 nm.

El principal efecto de la radiación ultravioleta es la **formación de enlaces covalentes entre restos de pirimidinas adyacentes** en una misma cadena, formando **dímeros de pirimidina** (generalmente dímeros de timina). Estos dímeros distorsionan la forma de la molécula de DNA e interfieren con el apareamiento normal de las bases, aumentando la probabilidad de error en la replicación. Además, en presencia de aire, se forma ozono. Este actúa sobre las bacterias y produce peróxidos, que intensifican la actividad antimicrobiana de la radiación como agente oxidante.

La radiación UV se usa en la preparación de **vacunas víricas inactivadas y bacterianas, cuartos de cultivo en laboratorios, envasado de antibióticos, ambientes de salas de prematuros y quirófanos, superficies, potabilización de aguas de mesa,** etc. Dada la escasa capacidad de penetración de los rayos UV se utilizan sobre las superficies o líquidos de poca opacidad. Los factores más destacados para alcanzar un tratamiento adecuado son:

- Longitud de onda de la radiación de la lámpara germicida.
- Dosis.
- Tiempo de exposición.
- Distancia entre el material y la lámpara.
- Susceptibilidad de los microorganismos frente a la radiación.

Para que se establezca el efecto de la luz UV sobre los microorganismos estos deben estar expuestos en forma directa. Cuando el procedimiento no es correcto, desciende la tasa de muerte y aumenta el número de alteraciones (mutaciones) en el genoma bacteriano. Muchos microorganismos tienen enzimas reparadoras que reparan el daño inducido en el DNA por la radiación ultravioleta.

Radiación Infrarroja

Las longitudes de ondas infrarrojas poseen poco poder de penetración y al parecer no matan a los microorganismos directamente. Sin embargo, la absorción de tales radiaciones da como resultado un incremento en la temperatura, exponiendo los microorganismos a temperaturas más elevadas que sus temperaturas óptimas de crecimiento. Lo mismo sucede con las microondas, es por eso que en la industria de los alimentos la utilización de hornos microondas no alcanza una temperatura adecuada para matar a los microorganismos que contaminan los alimentos.

7. Bibliografía

Ingraham J, Ingraham C. (1998). Introducción a la Microbiología. Ed. Reverté S.A., Barcelona, España.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2014). Crecimiento microbiano. En: ***Brock Biología de los microorganismos***. 12° Edición. Editorial Pearson Educación, S.A., pág. 172–190.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2002). Microbial Nutrition. In: ***Microbiology***. Editorial McGraw Hill, United States.

Stanier R, Doudoroff M., Adelberg E. (1977). *Microbiología*. 2° Edición y posteriores. Ed. Reverté SA, Barcelona, España.

TEÓRICO PRÁCTICO 4.

MÉTODOS DE SIEMBRA Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS. INFLUENCIA DEL AMBIENTE FÍSICO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

A partir de una muestra de agua de un lago se preparó una dilución 10^{-2} y se sembró con espátula de Drigaslky 0,1 ml de dicha dilución en 5 placas con los siguientes medios: Agar nutritivo, Agar Mac Conkey, Agar EMB, Agar Cetrimide y Agar Manitol Salado. Todos los medios de cultivos fueron incubados a 37° C durante 48 h. Los resultados obtenidos son los siguientes:

- Agar nutritivo: 62 colonias; Agar Mac Conkey: 18 colonias; Agar EMB: 12 colonias; Agar Cetrimide: 5 colonias; Agar Manitol Salado: sin crecimiento

1) Indique cómo esterilizaría dichos medios (Ayuda: debería conocer la composición química de cada uno de ellos). Fundamente su respuesta.

2) Identifique en los diferentes medios de cultivo los macro y micronutrientes. Fundamente su respuesta. Teniendo en cuenta la estructura de una célula bacteriana, indique los posibles sitios donde son necesarios los distintos componentes que se aportan en el medio de cultivo.

3) ¿Cómo clasifica dichos medios de cultivo?

4) Indique cómo se clasifican nutricionalmente los microorganismos que podrían desarrollar en los diferentes medios de cultivos utilizados. Tenga en cuenta la fuente de carbono, fuente de poder reductor y fuente de energía.

5) Explicar a qué se deben las diferencias observadas en el número de colonias que aparecen en cada medio considerando que se inoculó la misma cantidad de muestra en cada uno.

6) ¿Cómo diseñaría un medio de cultivo para aumentar el número de bacterias quimiolitótrofas a partir de la muestra de agua del lago? Identifique la fuente de carbono, fuente de poder reductor y fuente de energía. ¿Qué condiciones de incubación debería utilizar? ¿Qué técnica de siembra utilizaría para tal fin?

7) ¿Sería posible aislar de esta muestra microorganismos psicrótrofos, psicrófilos, mesófilos, termófilos, hipertermófilos? ¿Por qué? ¿Qué características estructurales presentan dichos microorganismos?

8) ¿Sería posible aislar de esta muestra microorganismos acidófilos, neutrófilos y basófilos? ¿Por qué? ¿Qué características estructurales presentan dichos microorganismos? ¿Cómo controlaría el pH del medio de cultivo, considerando los rangos ácidos, neutros y alcalinos?

9) ¿Cómo prepararía el medio de cultivo si necesita aislar a partir de la muestra de lago un microorganismo quimioheterótrofo, auxótrofo para lisina? ¿Qué condiciones de incubación adoptaría si el mismo es mesófilo y aerobio?

10) ¿Qué condiciones necesitaría controlar para aislar los siguientes microorganismos: a) quimioheterótrofo y microaerófilo, b) quimioheterótrofo y anerobio estricto? ¿Qué técnica de siembra utilizaría para tal fin? ¿Cómo diseñaría los medios de cultivo para ambos microorganismos?

11) Esquematice como espera observar en un tubo con agar nutritivo semisólido el desarrollo de los siguientes microorganismos: aerobio estricto, microaerófilo, aerobio-anaerobio facultativo, aerotolerante, anaerobio estricto. Relacione el metabolismo productor de energía y las enzimas que neutralizan las formas tóxicas del oxígeno en cada microorganismo anterior. ¿Cómo controlaría la provisión de oxígeno en cada caso?

12) ¿Qué métodos usaría para conservar cada una de las cepas puras aisladas? Fundamente su respuesta.

LABORATORIO 3.

MÉTODOS DE SIEMBRA Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS. INFLUENCIA DEL AMBIENTE FÍSICO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

OBJETIVOS

- Adquirir conocimientos sobre los distintos métodos de siembra.
- Adquirir criterio en la elección de los distintos medios de cultivo.
- Utilizar factores físicos y químicos como herramienta microbiológica para estimular o inhibir el desarrollo microbiano.

DESARROLLO PRÁCTICO

Primer día:

Cada subgrupo contará con un cultivo líquido de uno de los siguientes microorganismos: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aureoginosa*

Siembra en placas de Petri en estrías por agotamiento

Cada subgrupo sembrará por diseminación en estrías por agotamiento una placa de cada uno de los siguientes medios de cultivos: agar nutritivo, agar Cetrimide, agar manitol salado, Agar EMB a fin de evaluar las características culturales de los diferentes microorganismos. Una vez sembradas las placas se incubarán a 37ºC durante 24 – 48 h.

Siembra en cajas de Petri con espátula de Drigalsky

Con pipeta estéril colocar 0,1 ml del inóculo sobre las placas de agar nutritivo (hacerlo por triplicado), diseminar inmediatamente con espátula de vidrio o metálica esterilizada a la llama del mechero. Incubar las placas a **tres temperaturas** diferentes: 4ºC, 37ºC y 56ºC durante 24 – 48º C a fin de evaluar el efecto de la temperatura en las diferentes especies bacterianas sembradas.

Siembra en placas de Petri con hisopo estéril

Embeber el hisopo estéril sumergiéndolo en el inóculo, presionar sobre las paredes del tubo a fin de sacar el excedente de inóculo. Diseminar en estrías paralelas en diferentes direcciones sobre las placas de agar nutritivo (hacerlo por triplicado).

Estas placas de agar nutritivo sembradas serán sometidas a la **acción de la luz UV**, durante diferentes intervalos de tiempo (30 s, 5 min, 30 min.), cubriendo previamente la mitad de cada placa con papel (control). Al cabo del período de exposición a la luz UV, retirar e incubar a 37ºC durante 24 – 48 h. Se evaluará el efecto del tiempo de exposición a la luz UV en las diferentes especies bacterianas sembradas.

Siembra en placa por el método de placa vertida

Tomar 1 ml del inóculo y colocarlo en el tubo que contiene el agar nutritivo fundido y enfriado a aproximadamente 45ºC, agitar a fin de homogeneizar. Verter el contenido del tubo en una placa de Petri vacía y estéril. Rotar la placa en varias direcciones para permitir su

homogeneización. Incubar a 37ºC durante 24 – 48 h. Se observará crecimiento en la superficie y en el agar. Si el volumen de inóculo es adecuado se observarán colonias aisladas.

Siembra en tubos

- **agar semisólido en columna**, con ansa recta y se siembra por punción. Se evaluará el comportamiento de los microorganismos frente al oxígeno y la movilidad.
- **agar sólido en pico de flauta**, con ansa recta o en anillo y se siembra en estrías.
- **agar sólido inclinado,** con ansa recta o en anillo y se siembra en estrías.
- **medio líquido**, con ansa recta o en anillo y se inocula en el caldo de cultivo por homogeneización.

Incubar todos los tubos a 37ºC durante 24 – 48 h.

Acción de distintos factores ambientales en el control del desarrollo microbiano: exponer los medios sembrados a distintas condiciones ambientales (según se mencionan anteriormente).

Segundo día:

a) Observar las características de desarrollo de los diferentes microorganismos en cada uno de los medios de cultivo.

b) Analizar los resultados y formular conclusiones.

c) Comparar los resultados obtenidos con cada una de las cepas y los informados en la bibliografía.

TRATAMIENTO DE LOS MATERIALES USADOS:

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

CAPÍTULO V.
MÉTODOS DE RECUENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS

1. Introducción

En cualquier sistema biológico, el crecimiento puede ser definido como el aumento ordenado de todos los componentes químicos de un organismo.

El crecimiento de una población o cultivo de microorganismos se puede expresar en función del aumento de la masa del cultivo o el aumento del número de células

El aumento de la masa por sí sólo, podría no indicar un crecimiento real, ya que las células pueden estar incrementando únicamente su contenido de reserva, tales como glucógeno o poli-β- hidroxibutírico. En un medio adecuado, en el cual los microorganismos se han adaptado perfectamente, estos se encuentran en un estado de "crecimiento equilibrado".

2. Estimación del crecimiento microbiano

Hay muchas técnicas para estimar el crecimiento de una población bacteriana, **ninguna resulta conveniente ni completamente satisfactoria en todos los casos.** Sus resultados deben ser interpretados con prudencia en razón de los errores y posibles interferencias, así como la posible diferenciación que permiten hacer entre células vivas y muertas.

2.1. ESTIMACIÓN DE LA MASA CELULAR

Determinación del peso húmedo

Procedimiento: se tara un tubo de centrífuga; se centrifuga el cultivo y se elimina el sobrenadante y, por último, se determina el peso del sedimento celular.

Utilidad: este método es aplicable a organismos unicelulares (levaduras y bacterias) y hongos filamentosos.

Desventajas: grandes errores, debido al líquido intercelular retenido, cuya cuantía depende a su vez de la forma y tipo de agrupaciones de la cepa, intensidad del empaquetamiento, etc.

Determinación del peso seco

Procedimiento: como el anterior, pero el sedimento se seca antes de ser pesado (105º C, toda la noche), hasta peso constante. Las medidas de peso seco suelen representar el 10-15% de los valores de peso húmedo.

Utilidad: como en el método anterior.

Desventajas: método tedioso (requiere mucho tiempo) y con bastantes errores, es necesario usar balanzas analíticas. 1 mg de peso seco equivale a aproximadamente 5 x 10^9 bacterias.

Métodos turbidimétricos (ópticos)

Fundamento: se basa en la capacidad de las células y partículas en general de absorber y/o dispersar la luz que incide sobre ellas (Figura 5.1). Un cultivo celular aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. La turbidez es proporcional al número de células y puede medirse utilizando un espectrofotómetro. El espectrofotómetro es un aparato que hace pasar la luz a través de una suspensión celular y detecta la luz no dispersada.

Este instrumento mide la relación de intensidad de **luz incidente** con la intensidad del rayo luminoso que sale después de atravesar la muestra. Cuanto mayor sea el número de células

mayor es la turbidez del cultivo, la densidad óptica (D.O.) y menor la cantidad de **luz no dispersada** que emerge tras atravesar la muestra. La D.O. del cultivo es pues proporcional a la densidad celular. Esto es así dentro de ciertos límites puesto que a elevadas concentraciones pueden formarse agregados celulares o producirse un efecto "pantalla" de unas células sobre otras.

Utilidad: este método es aplicable a organismos unicelulares (levaduras y bacterias).

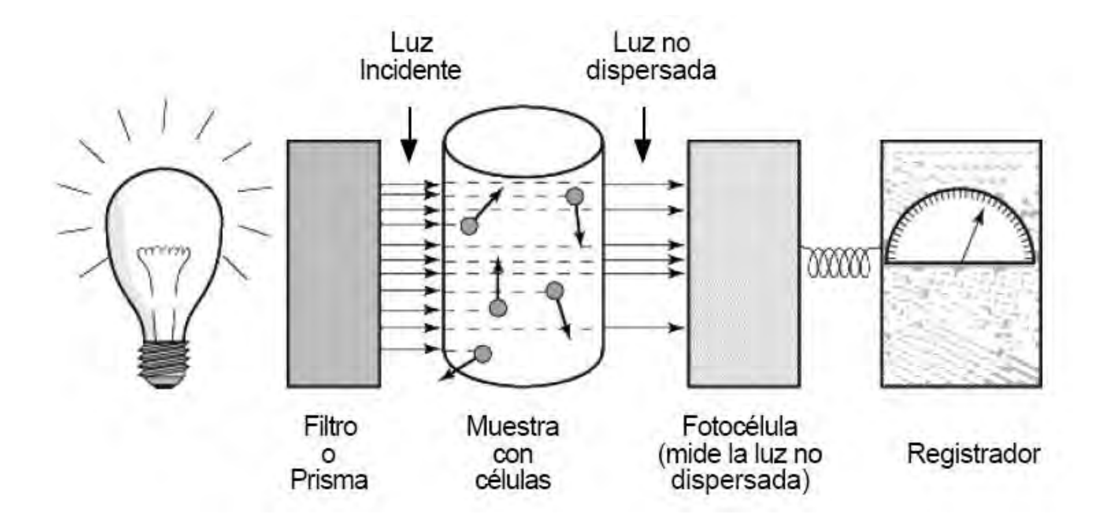


Figura 5.1. Medida de la turbidez del cultivo

Otros métodos

Determinación del nitrógeno total: técnica de micro-Kjeldahl; determinación de un componente característico: peptidoglucano, ADN, ARN, proteínas, etc.; medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo (consumo de oxígeno, QO_2, y consumo de dióxido de carbono, QCO_2, producción de ácidos, etc.).

2.2. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

Recuento total de células al microscopio

Fundamento: se requiere de *cámaras especiales de contaje*, tales como la de Petroff-Hausser (Figura 5.2). La cámara consta de 25 cuadrados grandes (cada uno dividido en 16 cuadrados más pequeños) con un área total de 1 mm^2 y una profundidad de 0,02 mm.

La muestra se coloca en la cámara, entre el portaobjetos y el cubreobjetos, se deja reposar sobre la plataforma del microscopio durante unos minutos, y se cuenta el número de células en varias celdillas o cuadrados (por lo menos en 5) y se calcula la media (por ejemplo 12 células).

Para calcular el número de células por mililitro de muestra:

12 células x 25 cuadrados x 50 (factor del volumen de la cámara) x 10^3 = 1,7 x 10^7 células/ml

Ventajas: es un método muy rápido, sencillo y económico.

Desventajas: sólo sirve para suspensiones relativamente concentradas (>10^6 cél/ml). Por debajo de este valor el número de células vistas en el campo del microscopio es muy pequeño

y poco significativo estadísticamente. En bacterias móviles, hay que inmovilizarlas previamente, con una mezcla de alcohol y agua.

Utilidad: este método es aplicable a organismos unicelulares (levaduras y bacterias) y esporas fúngicas.

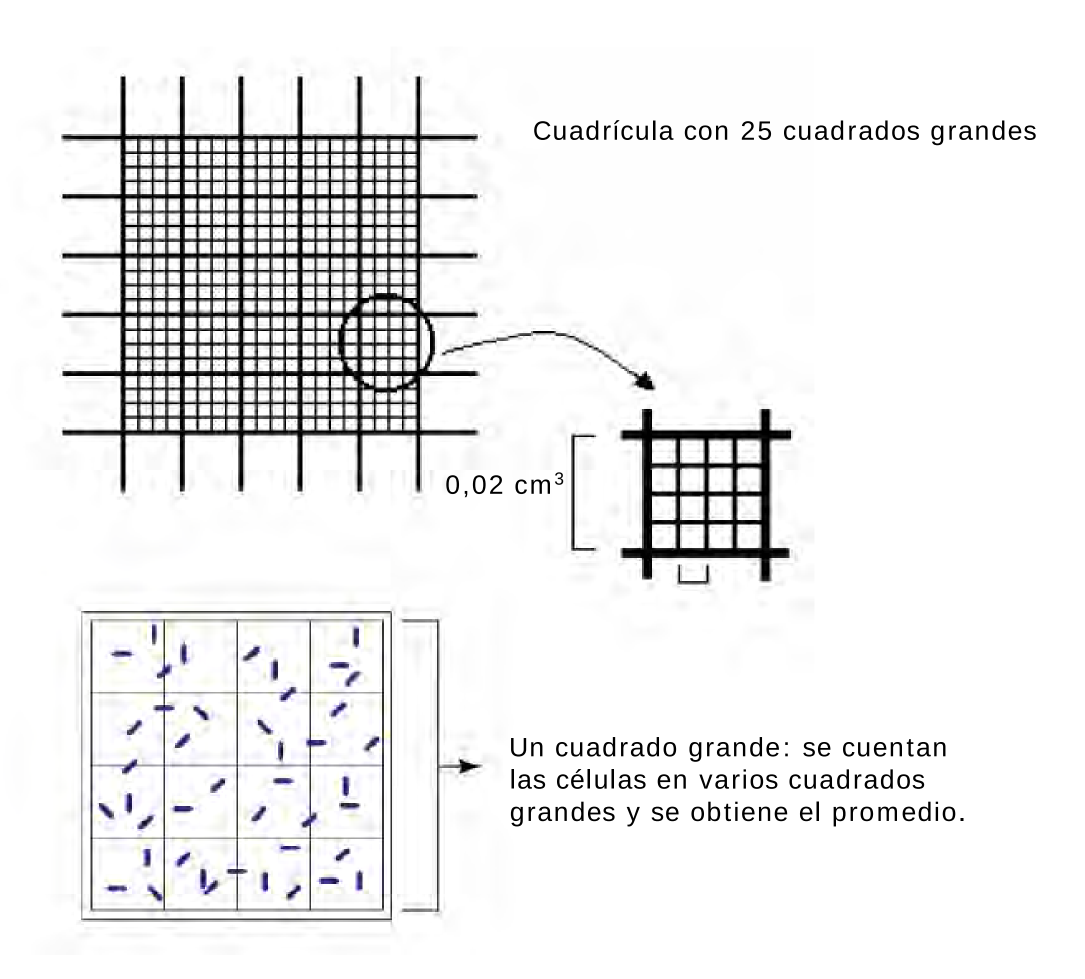


Figura 5.2. Contaje directo al microscopio

Método del número más probable (NMP)

Fundamento: este método se fundamenta en el presupuesto de que en una serie de diluciones de la muestra sembradas en tubos con medio líquido, para que se observe desarrollo en el tubo debe por lo menos haber una célula en el inóculo sembrado. Con esta consigna y aplicando análisis probabilístico según las diluciones y cantidades de tubos de la serie usada (triplicado, quintuplicado u otras variantes) se construyen tablas del NMP/100 ml de muestra, que se puede calcular con un 95% de confianza para cada una de las situaciones numéricas de la serie usada (Tabla 5.1).

Por ejemplo, una serie muy usada en el análisis de aguas es la serie de tres diluciones por triplicado, en ella se siembran 3 tubos de 10 ml de muestra, seguido de 3 de 1 ml y 3 de 0,1 ml. Luego de la incubación se observa el crecimiento en los tubos buscando el límite de crecimiento (el primer tubo sin desarrollo de la serie) y a partir de él se establece el número indicativo de la serie para buscar su equivalente en NMP/100 en la tabla correspondiente.

Supongamos que el número de tubos positivos por serie de tres resultan **3, 1, 0** respectivamente; esta combinación en la tabla nos indica un NMP de 43/100. Desde el punto de vista estadístico esto significa que el 95% de las muestras de agua que dan este resultado contienen entre 7 y 210 bacterias y el número más probable es 43.

Tabla 5.1. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se utilizan tres alícuotas de 10 ml, 3 de 1 ml y tres de 0,1 ml.

Número de tubos positivos del total de			Índice del NMP por 100 ml	Límites de confianza	
3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0,1 ml		Inferior	Superior
0	0	1	3	0,5	9
0	1	0	3	0,5	13
1	0	0	4	0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
2	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Recuento de viables en placa

Fundamento: permite la determinación de los microorganismos presentes en una muestra en base a su desarrollo en medio de cultivo en placas, formando colonias. Por lo tanto, se determinan por este método sólo las células microbianas viables en las condiciones de trabajo elegidas (nutrientes, atmósfera, temperatura) (Figura 5.3). Una ventaja importante de esta técnica es que mide el número de células viables. Una desventaja es que se requiere bastante tiempo, por lo general 24 h o más, para que se formen las colonias viables.

Utilidad: este método es aplicable a organismos unicelulares (levaduras y bacterias) y hongos filamentosos.

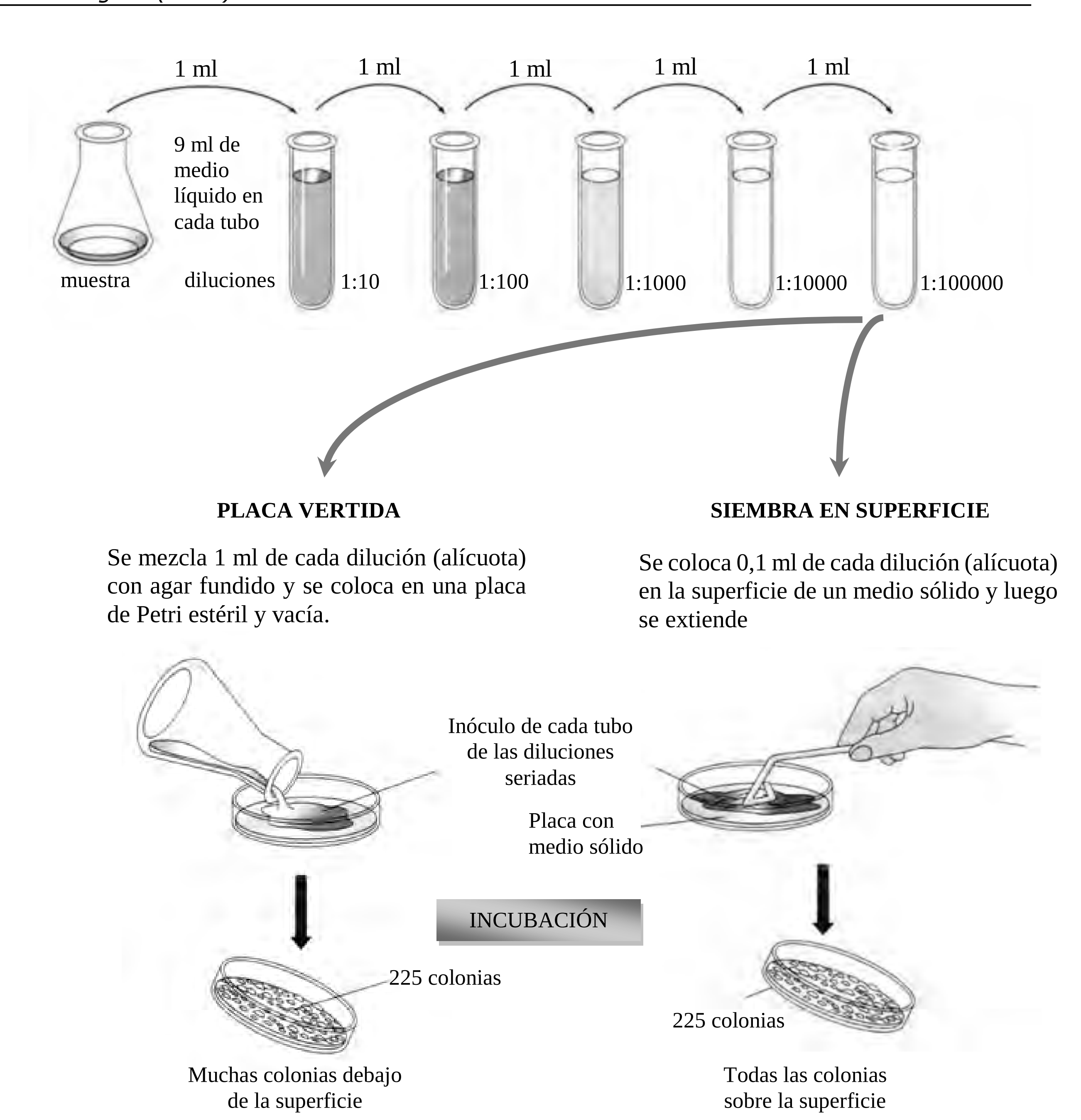


Figura 5.3. Recuento de células viables en placa (Fuente: Ingraham J & Ingraham C. Introducción a la Microbiología. Ed Reverté SA, España, 1998)

Para calcular el número de unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo de muestra (UFC/g o UFC/ml), se procede de la siguiente manera:

Siembra en superficie:

Promedio del número de colonias	**x**	**factor de dilución**	**x**	**factos de alícuota**	**=**	**UFC/g o UFC/ml**		
225	**x**	**10^5**	**x**	**10**	**=**	**$2,25 \times 10^8$ ufc/ml**		

Siembra en profundidad:

Promedio del número de colonias	**x**	**factor de dilución**	**x**	**factos de alícuota**	**=**	**UFC/g o UFC/ml**
225	**x**	**10^5**	**x**	**1**	**=**	**$2,25 \times 10^7$ ufc/ml**

Determinación de la proporción células viables/células totales

Si se está interesado en conocer esa proporción se recurre a una técnica de **microcultivos en cubreobjetos,** hay que seguir periódicamente la evolución del crecimiento de células individuales y determinar la proporción de aquellas células no viables (visibles al microscopio, pero incapaces de crecer).

Recuento sobre filtros de nitrocelulosa

Se usa para suspensiones diluidas de bacterias. Se hace pasar un gran volumen de suspensión a través de una membrana de nitrocelulosa estéril, que retiene las bacterias. Posteriormente, el filtro se deposita sobre la superficie de un medio de cultivo sólido. Las colonias se forman sobre el filtro y se cuentan, deduciéndose la concentración original en función del volumen de suspensión que se hizo pasar por el filtro.

Otros métodos

Recuento en preparaciones teñidas, recuento proporcional de Wright, contadores electrónicos de partículas (tipo Coulter), etc.

3. Bibliografía

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2014). Crecimiento microbiano. En: ***Brock Biología de los microorganismos***. 12º Edición. Editorial Pearson Educación, S.A., pág. 161–172.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2002). Microbial Growth. In: *Microbiology*. 5º Edición.

Stanier R, Doudoroff M., Adelberg E. (1977). *Microbiología*. 2° Edición y posteriores. Ed. Reverté SA, Barcelona, España.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2007). Crecimiento de cultivos bacterianos. En: ***Introducción a la Microbiología***. 9º Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina, pág. 174–183.

TEORICO PRÁCTICO 5.
MÉTODOS DE RECUENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS

Llegan a su laboratorio **5 muestras de leche entera pasteurizada** (muestras A–E) y debe determinarle la calidad microbiológica.

El Art. 558. Res. MSyAS N° 047/98 del Código Alimentario Argentino establece que la leche entera pasteurizada debe estar exenta de gérmenes patógenos. Esta exigencia no se dará por cumplida si presenta:

1. Recuento total en placa: $>5x10^4$ bacterias mesófilas/cm^3 en los meses de abril a septiembre inclusive y, $>1x10^5$ bacterias/cm^3 en los meses de octubre a marzo, inclusive.
2. Bacterias coliformes (recuento en placa en agar-violeta-rojo-bilis): >50 bacterias/cm^3.
3. *Escherichia coli*: presencia en 1 cm^3. Debe ser confirmada por pruebas bioquímicas.

1. De acuerdo a las exigencias del Código Alimentario Argentino, decide realizar un **recuento microscópico directo**. ¿Es esto correcto? ¿Por qué? ¿Qué resultado esperaría obtener? Enumere las ventajas y desventajas de este método de estimación.

2. Luego, realiza el **recuento total de bacterias mesófilas en placa** en Agar Recuento en Placa (APC). ¿De acuerdo a la composición de dicho medio, cómo lo clasificaría? ¿Qué método de siembra y condiciones de cultivo debe utilizar? ¿Por qué? ¿Qué materiales necesita preparar para realizar dicha determinación? ¿Cómo los esterilizaría?

Al realizar el recuento total de bacterias aerobias mesófilas en el medio APC obtiene los resultados presentados en la **Tabla 1**. Informe los resultados de las 5 determinaciones. Enumere las ventajas y desventajas de este método de estimación.

Tabla1. Recuento total de bacterias aerobias mesófilas en las 5 muestras de leche.

Dilución	Muestras				
	A (placa1/placa2)	**B** (placa1/placa2)	**C** (placa1/placa2)	**D** (placa1/placa2)	**E** (placa1/placa2)
1/10	CF	945/899	780/820	45/52	CF
1/100	890/921	208/160	105/112	5/10	925/885
1/1000	175/197	40/48	32/27	0/0	135/129
1/10000	43/50	3/12	2/0	0/0	35/28

CF: crecimiento confluente

3. El **recuento de coliformes totales** lo realiza por el método del número más probable (NMP) en medio Caldo Verde Brillante Lactosa 2% sales biliares. ¿De acuerdo a su composición, cómo lo clasificaría? Fundamente su respuesta. ¿Qué método de siembra y condiciones de cultivo utilizaría? ¿Por qué? ¿Cómo esterilizaría dicho medio de cultivo?

Al determinar el NMP de coliformes totales en el medio Caldo Verde Brillante Lactosa 2% sales biliares obtiene los resultados presentados en la **Tabla 2**. Informe los resultados de las 5 determinaciones. Indique la reacción positiva típica. Enumere las ventajas y desventajas de este método de estimación.

Indique cómo confirmaría la presencia de coliformes a partir de los tubos positivos en el medio Caldo Verde Brillante Lactosa 2% sales biliares (NMP). Fundamente su respuesta.

Tabla 2. Determinación de coliformes totales por el método de NMP en las 5 muestras de leche.

Serie	Tubos	Volumen de medio (ml)	Volumen de muestra (ml)	Muestras				
				A	B	C	D	E
1	1	10 DC	10	+	+	+	+	+
	1			+	+	-	+	+
	1			-	+	-	-	+
2	2	10 SC	1	+	+	-	-	-
	2			-	+	-	-	-
	2			-	-	-	-	-
3	3	10 SC	0,1	-	+	-	-	+
	3			-	-	-	-	+
	3			-	-	-	-	-
			Resultado					

DC: doble concentración; SC: simple concentración

4. De acuerdo a los resultados obtenidos, ¿podría aceptar o rechazar las muestras de leche? ¿Por qué? Fundamente su respuesta.

5. A partir del análisis de las 5 muestras de leche Ud. ha podido aislar una cepa de *Escherichia coli* y decide realizar una curva de calibración de recuento en placa vs. turbidez (D.O. leída a 600 nm). A partir de la misma establece una relación UFC/ml por unidad de D.O. de $4x10^7$. ¿Qué ventajas tiene realizar una curva de calibración de recuento vs turbidez?

Al realizar una curva de turbidez de la cepa de *E. coli*, Ud. obtiene los resultados expresados en la **Tabla 3**. Calcule el N° cél/ml de acuerdo a la relación obtenida. Grafique los datos en escala aritmética y semilogarítmica. ¿Qué ventajas obtiene si la representación gráfica la efectúa en escala semilogarítmica? ¿Cuál es la ecuación que refleja el crecimiento en esta etapa logarítmica o exponencial (partiendo del número inicial N_0)? Fundamente su respuesta. Enumere las ventajas y desventajas del método turbidimétrico.

Tabla 3. D.O. obtenida a 600 nm de un cultivo de *E. coli*

Tiempo (h)	D.O.	Nf= Nº cél/ml	Log_{10} Nº cél/ml
8:00	0,03		
8:30	0,041		
9:00	0,102		
9:30	0,282		
10:00	0,425		
11:00	0,620		
12:00	0,850		
13:00	1,215		
14:00	1,416		
15:00	1,612		

Calcule el número de generaciones que ocurren en el cultivo bacteriano si pasó de 1.000 células/ml a 1.5×10^8 células/ml. Calcule la velocidad de crecimiento, sabiendo que la variación ocurrió en 12 h. ¿Cuál fue el tiempo de generación y qué representa dicho tiempo?

¿Cómo influye la velocidad de crecimiento sobre el tamaño y composición macromolecular de las células? ¿En qué caso el incremento de la masa celular no refleja crecimiento?

6. ¿Qué curva de crecimiento obtendrá, si el cultivo de *E. coli* que crece exponencialmente en un caldo nutritivo es inoculado en el medio fresco, bajo las mismas condiciones de crecimiento? ¿Cómo es la curva de crecimiento si dicho cultivo que crece exponencialmente es inoculado en un medio fresco más pobre al que estaba creciendo? ¿Cómo será la curva de crecimiento si el inóculo se toma a partir de un cultivo en fase estacionaria y se inocula en un medio fresco de la misma composición? ¿Y si se inocula a otro de diferentes composición? En todos los casos, fundamente su respuesta.

LABORATORIO 4.
MÉTODOS DE RECUENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS

OBJETIVOS

- Conocer diferentes métodos para estimar el crecimiento microbiano
- Analizar los efectos del medio ambiente sobre el desarrollo de los microorganismos
- Aplicación práctica de las técnicas de medición del crecimiento microbiano

DESARROLLO PRÁCTICO

Primer día:

Determinar la curva de crecimiento de una cepa de *Staphylococcus* sp. midiendo el incremento de la masa celular (Densidad óptica) en el tiempo

Preparación del inoculo: Sembrar 1 ml del cultivo de *Staphylococcus* sp. en un frasco Erlenmeyer que contiene 100 ml de caldo nutritivo, incubar a 150 rpm en un baño a 37º C durante 12 h. Luego del período de incubación, tomar una alícuota de dicho cultivo y medir su absorbancia (DO) a 640 nm.

Comparar el crecimiento de la cepa en diferentes tipos de medios de cultivo

Crecimiento control: inocular 1 ml del cultivo del microorganismo de 12 h a un frasco Erlenmeyer con 100 ml de caldo de cultivo fresco, incubar a 150 rpm en un baño a 37º C. Medir la DO cada 30 min a 1 h aproximadamente, hasta T10. Tabular las lecturas de DO.

Influencia del antibiótico sobre el crecimiento microbiano: inocular 1 ml del cultivo del microorganismo de 12 h a un frasco Erlenmeyer con 100 ml caldo de cultivo fresco, incubar a 150 rpm en un baño a 37ºC. Medir la DO cada 30 min a 1 h y al tiempo 6 (T6) aproximadamente, adicionar el antibiótico a la concentración adecuada. Tabular las lecturas de DO.

Recuento de células viables por el método de dilución a partir del cultivo control y cultivo con antibiótico

A partir del **cultivo control** y del **cultivo con antibiótico** a tiempo 6, extraer 2 ml del mismo y realizar el recuento de células viables. A partir de cada cultivo realizar diluciones seriadas factor 10 en solución fisiológica y sembrar 0,1 ml de cada dilución sobre placas de agar nutritivo por duplicado. Incubar a 37ºC durante 24 - 48 h. Realizar el recuento y expresar los resultados como UFC/ml.

Recuento directo al microscopio

Cargar la cámara de recuento a partir de un cultivo de levaduras que posea una suspensión aproximada de 10^6 cél/ml, utilizando una pipeta Pasteur. Contar al microscopio y estimar el recuento de células teniendo en cuenta las características de la cámara y las diluciones practicadas. Expresar los resultados en cél/ml.

Determinación del número de bacterias por la técnica del NMP

Se practicará el recuento de bacterias coliformes totales en una muestra de agua de río o de pozo u otra, procediendo de la siguiente manera:

– Sembrar las siguientes series de tres tubos con el medio Mac Conkey:
    - 10 ml de agua en 3 tubos con 10 ml de medio de doble concentración
    - 1 ml de agua en 3 tubos con 10 ml de medio de simple concentración.
    - 0,1 ml de agua en 3 tubos con 10 ml de medio de simple concentración.
– Incubar los tubos a 37°C por 24 - 48 h.

Caldo Mac Conkey: Peptona de caseína 20 g, lactosa 10 g, bilis de buey desecada 5 g, púrpura de bromocresol 0,01 g, agua destilada 1000 ml, pH=7

Segundo día

– Confeccionar las curvas de crecimiento a partir de los resultados obtenidos de DO a partir del cultivo de crecimiento control y del cultivo de crecimiento con antibiótico. Calcular los parámetros de crecimiento en cada curva y comparar.
– Realizar los recuentos de células viables en las placas. Calcular y tabular los recuentos de viables en cada curva.
– Observar los tubos de NMP con reacción positiva (producción de gas y viraje ácido del medio), armar el número de serie, obtener el número de tabla y calcular el NMP.

Responda las siguientes preguntas

- ¿Qué efecto tendría sobre la curva de crecimiento bacteriano (crecimiento control) cada una de las siguientes condiciones?
    a) Incubar en un baño con agitación a 25°C
    b) Incubar en un baño con agitación a 30°C
    c) Incubar en un baño con agitación a 37°C
    d) Utilizar como inóculo un cultivo de 48 hs de crecimiento en vez de las 12 hs recomendadas.

TRATAMIENTO DE LOS MATERIALES USADOS:

– Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
– Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
– Lávese las manos con jabón.

CAPÍTULO VI.
INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE FÍSICO y QUÍMICO

1. Introducción

Existen ciertas sustancias químicas que influyen negativamente sobre los microorganismos, pudiendo ejercer dos tipos de efectos diferentes:

- **bacteriostáticos**: cuando impiden o inhiben el crecimiento bacteriano;
- **bactericidas**: cuando destruyen (matan) las bacterias.

En general, sino sólo nos referimos a las bacterias, sino a cualquier tipo de microorganismos, hablamos de agentes **microbiostáticos** y **microbicidas,** respectivamente.

La acción de agentes químicos sobre los microorganismos nunca es instantánea y a menudo está afectada por una serie de factores:

1. Factores propios del microorganismo (susceptibilidad de la cepa, tipo y número de microorganismos, edad del cultivo bacteriano).
2. Factores propios del agente químico (mecanismo de acción, concentración).
3. Factores ambientales (temperatura, pH, O_2, presencia de materia orgánica).

2. Determinación de la potencia de un desinfectante

La determinación de la actividad desinfectante de un determinado agente es necesaria para conocer su posible eficacia. Durante muchos años la prueba de referencia fue la prueba del **coeficiente fenol o coeficiente fenólico**. En esta prueba se comparaba la potencia o efectividad del compuesto a ensayar con la del fenol. Actualmente se reconocen ciertas limitaciones a esta prueba:

- El coeficiente fenol sólo es indicativo cuantitativamente en desinfectantes químicamente similares al fenol, y que tengan coeficientes de dilución (n) parecidos.
- Aun cuando conozcamos el coeficiente fenol de un compuesto, su valor indicativo se limita a las diluciones que se hayan empleado en la determinación.
- Hay que atender a las condiciones de valoración, ya que como dijimos antes, la presencia de materia orgánica supone una merma del poder *real* de desinfección.

Para solucionar algunos de estos inconvenientes se han puesto a punto otros métodos de valoración que se detallan a continuación.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima

En este método se determina el poder bacteriostático o bactericida de un agente químico particular.

El **poder bacteriostático** se obtiene mediante el coeficiente de inhibición (CIM), es decir, determinando la concentración mínima de dicha sustancia capaz de inhibir el crecimiento y reproducción de una bacteria.

El **poder bactericida** (CBM) o concentración bactericida mínima, se determina calculando la cantidad mínima de dicha sustancia capaz de producir la muerte de una suspensión patrón en un tiempo determinado. Si se trata de células vegetativas, se obtiene el coeficiente letal mínimo y si se trata de bacterias esporuladas, el coeficiente letal máximo.

Prueba de utilidad de la dilución

Otro método estándar utilizado en la actualidad es la prueba de utilidad de la dilución de la American Oficial Analytical Chemist. En la mayoría de los casos las tres bacterias utilizadas en esta prueba son *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se utilizan anillos metálicos que se sumergen en el cultivo microbiano líquidos estandarizado de la bacteria a probar; luego los anillos se retiran del cultivo, se secan a 37ºC. Los cultivos secos se colocan en una solución del agente químico a la concentración recomendada por el fabricante y se dejan allí durante 10 min. a 20ºC. Luego de la exposición los anillos se transfieren a un medio que permitirá el desarrollo de las bacterias sobrevivientes. La eficiencia del desinfectante puede evaluarse mediante la cantidad de cultivos que crecen.

Método de difusión con disco

Este método es muy utilizado en la valoración del efecto inhibitorio de un desinfectante debido a su practicidad. Los discos de papel de filtro se embeben con las sustancias químicas a ensayar, se elimina el exceso y se colocan equidistantes entre sí sobre una placa de agar conteniendo el cultivo bacteriano. Se utiliza un inóculo estandarizado (10^6 cel/ml) y se siembra en superficie (0,1 ml) sobre el medio de cultivo, generalmente agar nutritivo. Se incuba a 37ºC durante 24 a 48 h. Si la sustancia química es eficaz, después de la incubación se observa un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco (Figura VI.1).

Este método estándar es el que se utiliza para determinar la susceptibilidad microbiana a los antibióticos (antibiograma) utilizando discos comerciales embebidos en determinadas concentraciones del agente químico.

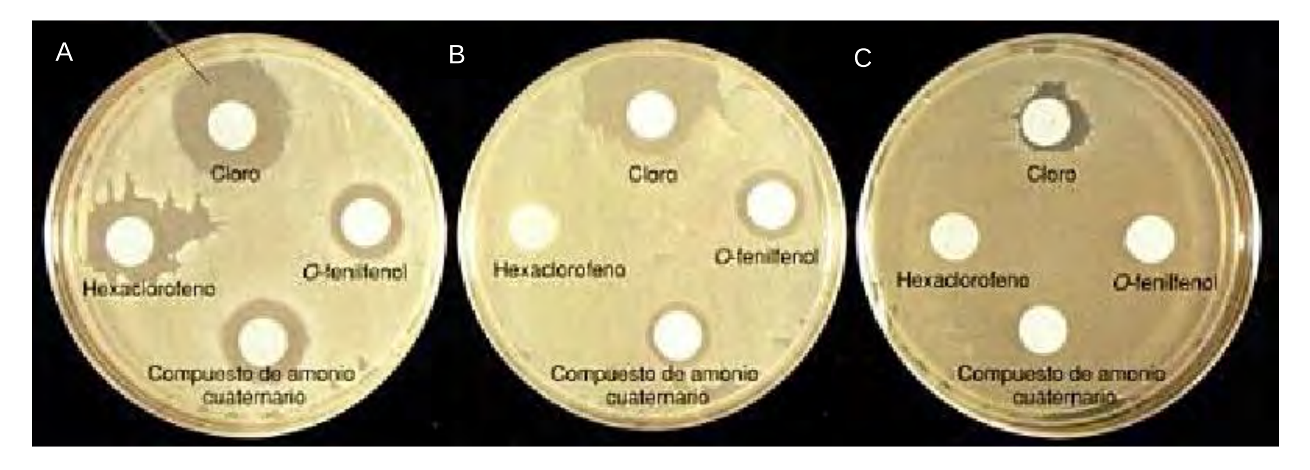


Figura VI.1. Método de difusión con disco. A) *Stahylococcus aureus*; B) *Escherichia coli*; C) *Pseudomonas aeruginosa* (Fuente: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2007).

3. Clasificación de las sustancias químicas de acuerdo a su toxicidad selectiva

- **Desinfectantes:** son aquellas sustancias químicas capaces de destruir en 10' - 15' los microorganismos patógenos depositados sobre un material inerte. Son, en general, potentes microbicidas y de acción tóxica o irritante para los tejidos vivos. Estas propiedades determinan su uso, únicamente sobre superficies, ambientes o aparatos.
- **Sanitizantes:** son sustancias químicas muy relacionadas a las desinfectantes. En la sanitización, la población microbiana es reducida a niveles que son considerados seguros desde el punto de vista de la salud pública. Se aplica a la limpieza de objetos inanimados, por ejemplo los utensilios de comida en un restaurant.

– **Antisépticos:** son aquellas sustancias químicas que evitan la existencia o desarrollo de gérmenes patógenos sobre la piel, mucosas, heridas, abrasiones, etc. Su toxicidad selectiva permite su uso sobre tejidos vivos de superficie: piel y mucosas externas.

– **Quimioterápicos:** son compuestos químicos, sintéticos o naturales con capacidad para producir la muerte o inhibir el desarrollo de determinados grupos de microorganismos, eficaces a concentraciones bajas y con alta toxicidad selectiva. Esta propiedad permite su uso por vía oral o parenteral y revaloriza el rol del agente quimioterápico en el control y tratamiento de las enfermedades infecciosas.

4. Criterios considerados para el uso adecuado de desinfectantes y antisépticos

La efectividad de los procesos de desinfección y antisepsia dependen de numerosos factores, cada uno de los cuales puede tener un efecto significativo sobre el resultado final. Ellos son:

- La naturaleza y el número de microorganismos contaminantes (en especial de esporas bacterianas), La concentración de la sustancia química y su tiempo de exposición,
- La cantidad de materia orgánica (suelo, heces, sangre, etc.) presente, el tipo y estado del material a tratar y la temperatura.

El conocimiento de la lista de componentes activos y el cumplimiento de las pautas generales y contraindicaciones que aparecen en el rótulo de un producto particular, aseguran el uso adecuado de los desinfectantes y antisépticos.

5. Desinfectantes y antisépticos de uso común en la práctica

Desinfectantes

Sustancia química	Concentración
Glutaraldehído (soluciones alcalinas pH 7,4 a 8,5)	2%
Peróxido de hidrógeno	6 - 25%
Derivados fenólicos con grupos funcionales Cl, I, bencilo, fenilo o amilo	2 – 5%
Halógeno (hipoclorito de sodio)	5 al 10%
Alcohol (etanol)	60 - 90%
Compuestos de amonio cuaternario acuosos	0,1 - 0,2%
Ácido peracético	1%

Antisépticos

Sustancia química	Concentración
Alcohol (etanol)	60 - 90%
Yodóforo (yodo-povidona) Polivinilpirrolidona	9 -12% iodo libre
Alcohol iodado (iodo en etanol al 70%)	2%
Peróxido de hidrógeno	1 - 6%
Biguanidinas (Gluconato de Clorhexidina)	0,5 - 4%
Bisfenólicos (Hexaclorofeno- triclosán)	1 - 3%
Compuestos mercuriales (derivados orgánicos: mercurocromo, mertiolate)	0,1 - 0,2%
Antimicrobiano y metal pesado (Sulfadiazina y plata: Sulfadiazina argéntica)	5%
Compuesto de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio en solución acuosa o alcohólica)	0,1%
Compuesto de amonio cuaternario (cloruro de cetilpiridinio)	0,05%

6. Bibliografía

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2014). Control del crecimiento microbiano. En: ***Brock Biología de los microorganismos***. 12º Edición. Editorial Pearson Educación, S.A., pág. 873–899.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2002). Control of Microorganisms by Physical and Chemical Agents. In: *Microbiology*. 5º Edición.

Pumarola A, Rodriguez-Torres A, García-Rodriguez JA, Piedrola-Angulo G. (1999) Microbiologia y Parasitología Médica. Salvat Editores S.A.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2007). Métodos químicos para el control microbiano. En: ***Introducción a la Microbiología***. 9º Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina, pág. 196–208.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2007). Requerimientos para el crecimiento. En: *Introducción a la Microbiología*. 9º Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina, pág. 160–167.

TEORICO PRÁCTICO 6.
INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE FÍSICO II Y QUÍMICO

PROBLEMA 1:

Ud. pertenece a un grupo de investigación que aisló una bacteria capaz de controlar el crecimiento de un hongo patógeno bajo condiciones *in vitro* en el laboratorio. El siguiente paso es probar su efectividad en un ensayo de invernadero y luego su aplicación a nivel de campo.

1) ¿Es posible mejorar la capacidad adaptativa de la bacteria en el laboratorio a fin de enfrentar amplias modificaciones en rangos de actividades acuosas y temperaturas que imperan en el campo? ¿Cómo diseñaría dicha experiencia?

2) Un punto muy importante del trabajo es el resguardo de la cepa bacteriana y por ello decide mantenerla usando dos métodos de conservación: liofilización y en freezer -80°C. Explique qué recaudos tomaría en ambos métodos para un mantenimiento adecuado de la cepa. ¿Es posible que el frío altere su viabilidad?

PROBLEMA 2:

Usted debe evaluar la efectividad de dos desinfectante que se usarán sobre superficies de las áreas de producción de una fábrica de pastas frescas. Uno de los desinfectantes tiene como principio activo un amonio cuaternario (AC) y el otro ácido peracético (PA) y se le pide a Ud. que los evalúe principalmente frente a dos microorganismos: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

1) Mencione las características de ambos microorganismos. ¿Por qué cree Ud. que solo le pidieron que evalúe los desinfectantes frente a estos dos microorganismos? Fundamente su respuesta. ¿Qué otros microorganismos podría evaluar? ¿Por qué?

2) Mencione las características de ambos desinfectantes. De acuerdo a las mismas, ¿sobre qué superficies podrían aplicarse? ¿Qué otros desinfectantes podría utilizar? Fundamente su respuesta.

3) ¿Qué otros factores debería tener en cuenta antes de evaluar la efectividad de los mismos? (tenga en cuenta las características que debe reunir un buen desinfectante).

4) Diseñe una experiencia para determinar el poder bacteriostático o bactericida de ambos desinfectantes (materiales, medios de cultivo, diluciones, tiempos, modo de preparación y esterilización, metodología, etc.). Dato: el fabricante del desinfectante AC recomienda una concentración entre 0,25% a 0,50% aplicada durante 5 min, mientras que el del desinfectante PA recomienda una concentración del 0,10% a 0,20% aplicada durante 10 min.

PROBLEMA 3:

1) Uno de los puntos más importantes a tener en cuenta respecto de la efectividad de compuestos desinfectantes y antisépticos es la concentración. ¿Cómo le explicaría a una persona que no tiene ningún conocimiento de microbiología el uso correcto de la lavandina y del alcohol como desinfectantes?

2) ¿Qué otras técnicas podría utilizar para valorar la efectividad de los desinfectantes y/o antisépticos? Fundamente su respuesta.

PROBLEMA 4:

En su laboratorio se realiza el análisis de una muestra proveniente de lesiones de aspecto necrótico presentes en la pierna izquierda de un estudiante de 18 años. El diagnóstico microbiológico, se realiza mediante aspiración dirigida por tomografía computarizada. En la tinción de Gram del aspirado de la herida, se observan cocos Gram (+) agrupados en racimo.

Luego de realizar las pruebas de aislamiento e identificación, el microorganismos sospechoso se identifica como *Staphylococcus aureus*. Ud. debe realizar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana para que el paciente inicie su tratamiento.

1) ¿A través de qué método podría valorar la efectividad de los antibióticos frente a dicha bacteria? Describa cómo lo realizaría. ¿Qué antibióticos probaría? ¿Por qué?

2) De acuerdo a los antibióticos que eligió probar, indique los sitios y modo de acción de los mismos. En base a los sitios de acción, ¿qué grupos de antibióticos que probó poseen mayor toxicidad selectiva? Fundamente su respuesta.

3) Antes de la aplicación del antibiótico seleccionado en el antibiograma, se le había aplicado otro antibiótico de amplio espectro al cual el paciente no respondió adecuadamente. Explique dicha situación.

LABORATORIO 5.
INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE FÍSICO Y QUÍMICO

OBJETIVOS

- Determinar el efecto de la actividad acuosa sobre el crecimiento de microorganismos de diferentes ambientes.
- Determinar el efecto de pH sobre el crecimiento de microorganismos de diferentes ambientes.
- Determinar el efecto inhibitorio de agentes químicos con distintos mecanismos de acción.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida mínima de un agente químico.

DESARROLLO PRÁCTICO

Primer día

Influencia de la concentración de glucosa y ClNa en el crecimiento

Cada subgrupo contará con un cultivo líquido de uno de los siguientes microorganismos:

a) *Escherichia coli*

b) Staphylococcus aureus

c) *Staphylococcus epidermidis*

d) *Saccharomyces rouxii*

e) *Saccharomyces bailii*

Inocular cada uno de los microorganismos en caldo nutritivo con a_W controlada usando una ansada de inóculo por tubo, de acuerdo al siguiente esquema:

% glucosa	a_W	*E. coli*	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*S. rouxii*	*S. bailii*
10 20 40	0,990 0,980 0,958					
% ClNa	a_W	*E. coli*	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*S. baillii*	*S. bailii*
2,5 10 20	0,989 0,940 0,875					

Incubar los tubos a 28 y 37ºC, según corresponda, durante 48 h.

Influencia del pH en el crecimiento

Cada subgrupo contará con un cultivo líquido de uno de los siguientes microorganismos:

a) *Escherichia coli*

b) *Proteus* spp.

c) *Lactobacillus* spp.

d) *Saccharomyces pombe*

Inocular cada uno de los microorganismos en caldo nutritivo con distintos valores de pH usando una ansada de inóculo por tubo, de acuerdo al siguiente esquema:

pH	*E. coli*	*Proteus* sp.	*Lactobacillus* sp.	*S. pombe*
4 7 10				

Incubar los tubos a 28 y 37º C, según corresponda, durante 48 h.

Luego del período de incubación registrar los resultados (tubos con crecimiento ó sin crecimiento).

Inhibición del crecimiento microbiano mediante el uso de sustancias antisépticas y desinfectantes

Cada subgrupo contará con un cultivo líquido de uno de los siguientes microorganismos:

a) *Pseudomonas aeruginosa*

b) *Escherichia coli*

c) *Staphylococcus aureus*

d) *Staphyloccus epidermidis*

Sembrar 0,1 ml de cada uno de los microorganismos en las placas que contienen agar nutritivo, dispersar el inóculo con espátula de Drigalsky esterilizada a la llama del mechero, dejar absorber el inóculo. Colocar con la ayuda de pinzas estériles (embebidas en alcohol y flameadas a la llama del mechero) discos de papel de filtro embebidos con diferentes sustancias antisépticas y desinfectantes. Incubar 24 – 48 h a 37ºC.

Se usarán las siguientes sustancias antimicrobianas:

1. Pervinox (Povidona - Iodo - Lauril éter - sulfato de sodio)
2. Espadol (cloroxilenol)
3. Mertiolate (timerosal)
4. DG 6 (cloruro de lapirium)
5. Ácido peracético
6. Cetrimide (N-cetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro)
7. Cristal violeta
8. Azul de metileno
9. Hipoclorito de sodio al 1%
10. Alcohol etílico al 70%

Determinación de la CIM y de la CBM de un desinfectante y/o antiséptico

Se usará un inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* desarrollado en caldo nutritivo.

Procedimiento:

1. Realizar diluciones seriadas factor 2 de **Pervinox** en agua destilada: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; 1/128; 1/256; 1/512. Para ello colocar 1 ml de Pervinox al primer tubo de la serie que contiene 1 ml de agua destilada. Homogeneizar y sacar 1 ml de dicha suspensión y colocarlo en el segundo tubo de la serie, proceder de igual manera con los siguientes tubos hasta lograr la última dilución.
2. Inocular cada uno de los tubos con caldo nutritivo con 1 ml del cultivo de *P. aeruginosa* (aproximadamente 10^6 cél/ml)
3. Inocular cada uno de los tubos anteriores con 1 ml de cada dilución de Pervinox. Dejar actuar 15 minutos.
4. Tomar 0,1 ml de cada una de las diluciones inoculadas anteriormente y extender con espátula de Drigalsky en placas de agar nutritivo (por duplicado). Incubar 24 – 48 h.
5. Por otro lado, incubar también los tubos inoculados en el punto 3 durante 24 – 48 h.

Segundo día

- Determinar la presencia o ausencia de crecimiento en los diferentes microorganismos evaluados bajo diferentes condiciones de a_w y pH.
- Observar la inhibición del crecimiento microbiano por la acción de las distintas sustancias químicas, registrar el diámetro del halo de inhibición. Comparar la susceptibilidad de las cepas a los diferentes agentes químicos.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la lectura de los tubos y la concentración bactericida mínima (CBM) de la lectura de las placas.
- En cada uno de los casos formular conclusiones.

TRATAMIENTO DE LOS MATERIALES USADOS:

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

CAPÍTULO VII.
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

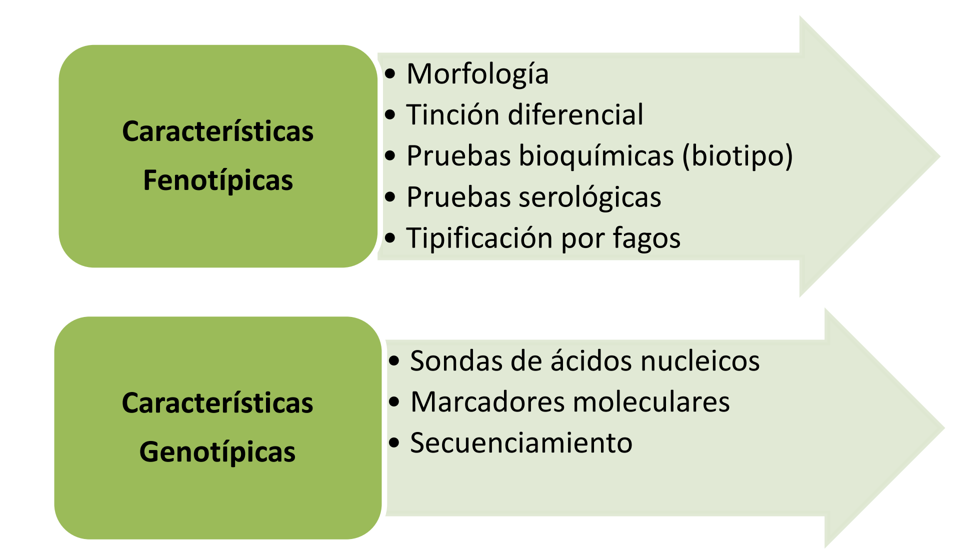
1. Introducción

Un esquema de clasificación proporciona una lista de características y un método de comparación para ayudar a la identificación de un organismo. Una vez identificado el organismo puede ubicarse en un esquema de clasificación concebido con anterioridad. Los microorganismos se **identifican** con fines prácticos, como por ejemplo para determinar un tratamiento adecuado para una infección.

En la literatura se encuentran descriptos una gran variedad de métodos de identificación. Seleccionar el mejor de estos métodos o el reemplazo de una prueba antigua por otra apropiada requiere extensos ensayos comparativos. Eligiendo métodos, también tiene que ser considerados un enorme número de medios y reactivos comerciales y sistemas de pruebas o ensayos múltiples. En general, cualquier método es satisfactorio si brinda resultados seguros y reproducibles. Las pruebas usadas en laboratorios de rutina para bacteriología clínica y de salud pública deberán ser aptas para brindar una identificación aceptablemente rápida y confiable.

2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

Los métodos más utilizados para la identificación microbiana, los podemos clasificar en base a si tienen en cuenta características fenotípicas o aquellos basados en características genotípicas:



En la mayoría de los casos la identificación no se realiza en base a un solo método, sino a la combinación de más de uno. Ejemplo: identificación de bacterias en base a criterios morfológicos, tinción diferencial, pruebas bioquímicas y serológicas.

3. MÉTODOS BASADOS EN CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Métodos basados en criterios morfológicos

Los rasgos morfológicos (estructurales) han ayudado a los taxónomos por muchos años a clasificar organismos. La morfología en general es fácil de estudiar y analizar particularmente en microorganismos eucariotas y procariotas más complejos. Además, las características estructurales dependen de la expresión de muchos genes que son usualmente estables y normalmente (al menos en eucariotas) no presentan gran variación con los cambios ambientales. Los organismos superiores tienen rasgos anatómicos tan diferentes que pueden ser fácilmente utilizados en su clasificación, pero con respecto a los microorganismos, éstos aparecen bajo el microscopio tan similares que se dificulta su clasificación. Es decir, que aquellos microorganismos que se ven tan parecidos bajo un microscopio, pueden diferir en propiedades bioquímicas, fisiológicas y/o serológicas. Sin embargo, aun cuando la morfología celular dice poco sobre las relaciones filogenéticas, sigue siendo útil para la identificación bacteriana. Por ejemplo, la presencia de endosporas y su localización resulta de mucha utilidad en la identificación de bacilos esporulados. Algunas de las características morfológicas empleadas en la identificación de microorganismos son: tamaño y forma celular, morfología de colonias, características ultraestructurales, etc.

Métodos basados en tinción diferencial

Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando una lámina que fue sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana. La mayor parte de las bacterias teñidas con Gram, las podemos clasificar como Gram positivas o Gram negativas. Un examen microscópico del portaobjeto teñido por medio de la coloración de Gram o de una tinción diferencial es útil para obtener una información rápida sobre la calidad de una determinada muestra.

Métodos basados en pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas han sido ampliamente utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc. Aún bacterias fuertemente relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes en base a pruebas bioquímicas. Por ejemplo, las bacterias entéricas Gram negativas forman un grupo muy grande y heterogéneo cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales. Esta familia, *Enterobacteriaceae*, incluye a varios patógenos que causan síndromes diarreicos. Un gran número de ensayos han sido desarrollados con el objeto de identificar rápidamente al patógeno, para que posteriormente el profesional médico, en base al informe, indique el tratamiento adecuado o para que los epidemiólogos puedan localizar la fuente de la infección.

A continuación se propone un esquema de trabajo para la identificación de una cepa bacteriana desde el punto de vista bioquímico (biotipo):

A. Obtención de un cultivo puro. Para determinar sus características, los microorganismos deben haber desarrollado en un cultivo puro, es decir un grupo de organismos que han desarrollado a partir de una célula única, o un único grupo de células iguales.

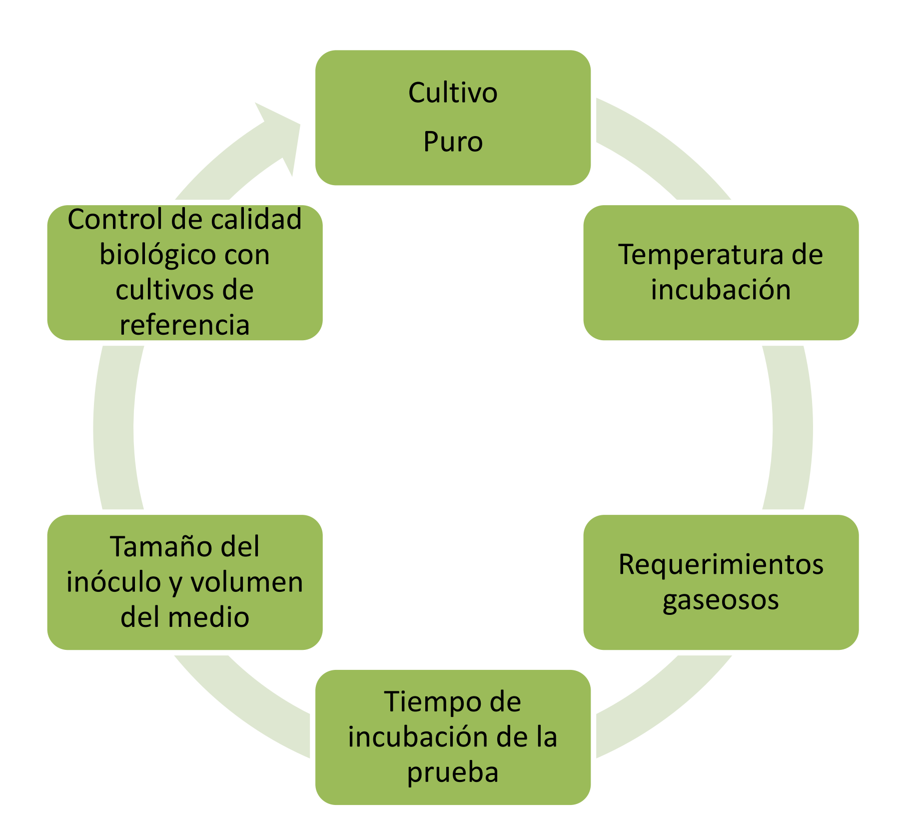
B. Examen microscópico de células vivas y de frotis teñido por coloración de Gram. Se determina así la forma y la respuesta a dicha coloración del microorganismo en estudio, la forma de agrupación, la presencia de esporas y otras características de interés.

C. Determinación de las características nutricionales. En general se desprenden de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo anteriores: fotoautótro, fotoheterótrofo, quimioautótrofo, quimioheterótrofo.

D. Realización de pruebas primarias. Permiten determinar el género, grupo de géneros o en algún caso la familia a la que pertenece una cepa. Estas pruebas son: Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF (oxido-fermentación), fermentación de la glucosa, presencia de endosporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad.

E. Realización de pruebas secundarias y terciarias a efectos de llegar a especie. Estas dependerán del género o familia determinado, por ejemplo: producción de pigmentos, de indol a partir de triptofano, producción de coagulasa, de fenilalanina desaminasa, etc.

Algunos factores que se deben tomar en cuenta al momento de identificar un microorganismo desde el punto de vista bioquímico son:



La identificación de un microorganismo puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de similitudes. Los ensayos bioquímicos tradicionalmente usados, llamados pruebas bioquímicas convencionales son pruebas simples que evidencian en forma rápida una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano. Existen numerosos sistemas de identificación totalmente automatizados, que simplifican mucho el trabajo y la interpretación de los resultados.

Para realizarlas, se pueden usar diferentes sistemas de trabajo (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.) que puede cambiar con diferentes organismos: por ejemplo, debe agregarse factores de crecimiento en el caso de estudiar la fermentación de distintos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente.

A la identificación de la especie se puede llegar según diversos sistemas: sistemas comerciales, manuales de identificación, etc. **Los sistemas comerciales**, usan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya sea sustratos deshidratados, tiras de papel de filtro impregnadas en reactivos o pequeños compartimentos con medios prontos para sembrar. En todos los casos, se emplean códigos numéricos para la

interpretación de los resultados. Una limitación de este tipo de método de identificación es la aparición de cepas mutantes y la adquisición de plásmidos que pueden dar origen a cepas con características diferentes. Este tipo de método de identificación también ha sido desarrollado para la identificación de levaduras y de otros hongos.

Los sistemas comerciales más frecuentemente usados son:

- **API 20E:** es un sistema estandarizado para la identificación rápida de bacterias Gram negativas y consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivos deshidratados que se reconstituyen al agregar la suspensión bacteriana. Permite realizar 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas a partir de una sola colonia bacteriana (Figura 7.1).

  Los microtubos se inoculan con una suspensión del microorganismo en estudio, en agua o solución salina, que hidrata los medios. Las tiras se incuban a 37° C y por efecto del metabolismo bacteriano se van a producir cambios de color espontáneamente o al añadir los respectivos reactivos. La lectura de las reacciones se hace mediante comparación con una tabla de lectura donde se indica si los microorganismos deben considerarse positivos o negativos para cada reacción según el color aparecido.

  Resultados: La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con los de la tabla de lectura.



Figura 7.1. API20E. a) todos los resultados positivos. B) todos los resultados negativos (http://www.tgw1916.net/Tests/api.html)

- **BBL, Enterotube II:** es un sistema para la identificación rápida de enterobacterias, definidas como bacilos Gram negativos, aerobios y aerobios facultativos, oxidasa (-). Es un tubo de plástico con 12 medios de cultivo contenidos en compartimentos individuales que se inoculan simultáneamiente en una etapa y permiten detectar 15 características bioquímicas.
- **OXI/FERM TUBE II:** es un sistema listo para usar para la identificación de bacilos Gram negativos, aerobios o aerobios facultativos, oxidasa (+). Consiste en un tubo de plástico de 12 medios de cultivo que permite la realización simultánea de 14 pruebas bioquímicas.
- **API 50 CH:** es un sistema listo para usar para la identificación de *Lactobacillus*.
- **Otros sistemas:**

  Quintet 3H de Diagnostico Pasteur para Enterobacterias.

  API 10S, versión miniaturizada del API 20 E

  API *Listeria*

  API NH (*Neisseria - Haemophilus*)

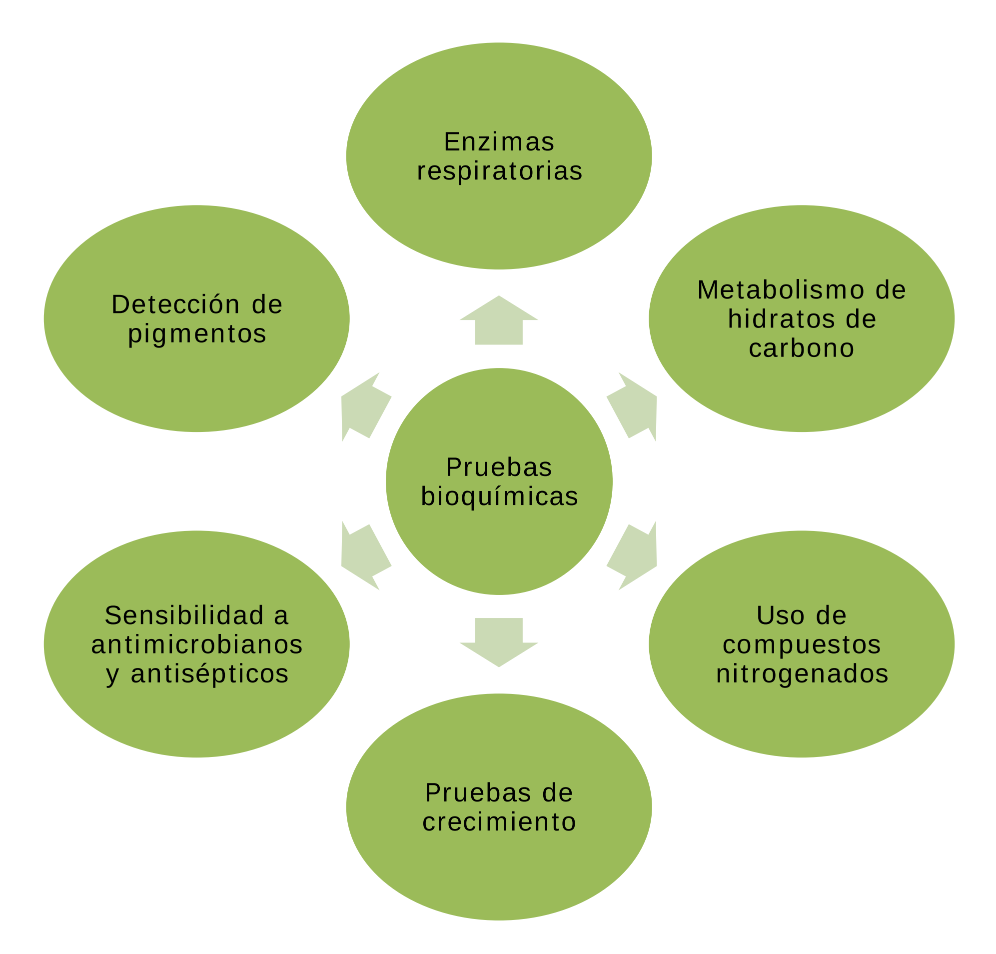
  API 20 C (para levaduras del género *Candida*)

  Auxacolor de Diagnostico Pasteur

  Fongiscreen 4H de Diagnostics Pasteur (identificación de levaduras de interés médico)

Cada laboratorio que trabaja en grupos especiales de microorganismos: bacterias lácticas, levaduras, enterobacterias, rhizobios, etc. han desarrollado sistemas propios de identificación.

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, se enumerarán a continuación las más usadas, agrupadas según el tipo de ensayo.



ENZIMAS RESPIRATORIAS

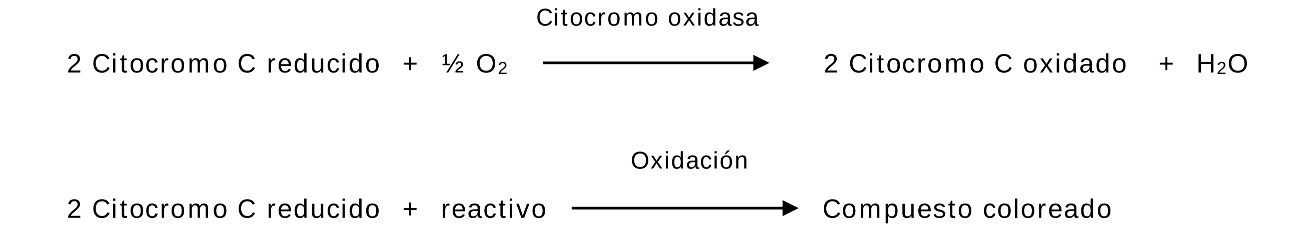
PRUEBA DE OXIDASA

Fundamento: Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y que actúan como último eslabón en la cadena de respiración aeróbica transfiriendo electrones al oxígeno con la formación de agua. El sistema de citocromos lo poseen los organismos aeróbicos facultativos por lo que la prueba de la oxidasa es importante en la identificación de aquellos organismos en los que falta la enzima, o son anaerobios estrictos.

La prueba de la citocromo oxidasa utiliza ciertos colorantes, tales como, el dimetil p-fenilen-diamina, que sustituyen al oxígeno como aceptor de electrones artificial. En el estado reducido el colorante es incoloro, sin embargo, en presencia de citocromo oxidasa y de oxígeno atmosférico el colorante es oxidado formando un compuesto azul (indofenol).

Procedimiento: Colocar un disco de oxidasa (embebido en dimetil p-fenilendiamina, adquirido comercialmente) en 0,2 ml de agua destilada en un tubo y suspender la colonia bacteriana.

Interpretación: Un color azul intenso dentro de los 30 segundos indica reacción positiva y evidencia de la presencia de la enzima citocromo oxidasa.



PRUEBA DE CATALASA

Fundamento: Todas las bacterias tienen enzimas capaces de reaccionar con el oxígeno, la variedad de las mismas determinan la relación fisiológica de los organismos con dicho compuesto. La oxidación de las flavoproteínas por el oxígeno da como resultado peróxido de hidrógeno y la acumulación de radicales libres tóxicos de O_2^- (superóxidos). La acumulación de O_2^- es prevenida por la enzima superóxido dismutasa y la del peróxido de hidrógeno por la enzima catalasa.

$$FPH_2 + O_2 \longrightarrow FP + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} H_2O + O_2$$

Los microorganismos aerobios y aerobios facultativos poseen las dos enzimas; los aerotolerantes poseen la superoxidodismutasa, mientras que los anaerobios estrictos no tienen ninguna de estas enzimas.

Procedimiento: Tomar con cuidado una colonia con el ansa de siembra (evitar tomar agar). Los cultivos deben ser frescos, de no más de 24 h, tampoco se pueden utilizar cultivos a partir de medios que tengan adicionada sangre porque la catalasa de los glóbulos rojos produce falsos positivos. Colocar la colonia directamente sobre un portaobjetos sin añadir agua y por último, colocar sobre la colonia una gota de agua oxigenada pura o al 30 % y observar si se forman burbujas.



Interpretación: La producción de burbujas de gas indica que el microorganismo es catalasa (+). Si la producción de gas es después de los 30 s se considera negativo.

USO DE COMPUESTOS NITROGENADOS

PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATO

Fundamento: La capacidad de reducir nitratos es una característica importante en la identificación y diferenciación de especies de muchos grupos de microorganismos. La reducción de los nitratos en las bacterias se lleva a cabo a través de diversas vías y siguiendo procesos que se pueden resumir de la siguiente manera:

- **Asimilación:** reducción de los NO_3^- hasta amoníaco que se incorpora al material celular (fuente de nitrógeno).
- **Desaminación:** reducción de los NO_3^- a NO_2^- al utilizarlos como aceptores finales de electrones (respiración anaeróbica).
- **Desnitrificación:** los NO_2^- se reducen hasta N_2 que se desprende del medio de cultivo.

La reducción de NO_3^- a NO_2^- se evidencia por el desarrollo de un color rojo cuando el NO_2^- reacciona con dos reactivos: ácido sulfanílico y dimetil α-naftilamina. El color resultante es debido a la formación de un compuesto diazoico, el p-sulfobenceno-α-2-naftilamina.

Procedimiento: Inocular el **caldo nitrato** (extracto de carne 3 g; peptona 5 g; nitrato potásico 1 g; agua destilada 1000 ml) con una ansada del organismo a estudiar aislado en cultivo puro (agar nutritivo o caldo tripticasa soya) e incubar a 37º C, durante 18 – 24 h. Al finalizar el período de incubación añadir una gota de dimetil α-naftilamina y ácido sulfanílico.

Interpretación: El desarrollo de un color rojo 30 s después de la adición de los reactivos (dimetil α-naftilamina y ácido sulfanílico) indica la presencia de NO_2^- y representa una reacción positiva para la reducción de NO_3^-.

Si no hay cambios de color después del agregado de los dos compuestos, puede indicar que o bien los NO_3^- no han sido reducidos (reacción negativa) o que han sido reducidos a amoníaco o a N_2. Puesto que los reactivos dimetil α-naftilamina y ácido sulfanílico solo detectan NO_2^-, si se realiza este último proceso podría llevarnos a una lectura falsa (-). Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de Zn a todas las reacciones negativas. Si después del agregado del Zn, hubiera cambios de color se comprueba la reacción negativa, ya que el Zn redujo el NO_3^- a NO_2^-. Si no hay cambio de color la reacción es positiva ya que los microorganismos pasaron el NO_3^- a NO_2^- y luego a N_2.

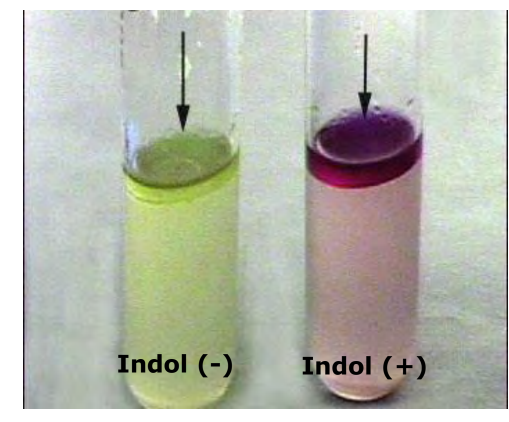
Sin el agragado de Zn	**Con el agregado de Zn**
Viraje del medio a rojo: nitrato reductasa (+)	Viraje del medio a rojo: nitrato reductasa (–)
No se observa cambios de color: nitrato reductasa (–)	No se observa cambios de color: nitrato reductasa (+)

PRUEBA DE DESAMINACIÓN E HIDRÓLISIS (INDOL)

Fundamento: Se detecta la presencia de la enzima **triptofanasa** que hidroliza el triptofano según la siguiente reacción:

$$\text{Triptofano} + H_2O \longrightarrow \text{Indol} + \text{ácido pirúvico} + NH_3$$

El Indol se puede detectar en un medio apropiado con el agregado del reactivo *p*-dimetil aminobenzaldehído (reactivo de Kovacs), el cual forma un producto de condensación rojo que al ser extraído con un solvente orgánico (alcohol amílico) forma un anillo de color rojo en la superficie.



Procedimiento: Agregar al cultivo bacteriano desarrollado en agua peptonada durante 24 h, 0.2 ml de reactivo de Kovac's (alcohol amílico + *p*-dimetil aminobenzaldehído) y agitar.

Interpretación:

Reacción (+): anillo rojo en la superficie.

Reacción (-): anillo amarillo en la superficie.

PRUEBA DE DESAMINACIÓN (FENILALANINA)

Fundamento: Se pone en evidencia la presencia de la enzima **fenilalanina deaminasa**, la cual cataliza el pasaje de fenilalanina a fenil pirúvico. Se detecta por el agregado de Cl_3Fe que reacciona con el fenilpirúvico dando un complejo verde oscuro.

Procedimiento: Se inocula un tubo conteniendo medio Fenilalanina y se incuba a 37º C durante 24 h. Luego, del periodo de incubación se agregan aproximadamente 5 gotas de cloruro férrico sobre el desarrollo bacteriano.

FA (+) FA (-)

Interpretación:

Reacción (+): verde oscuro

Reacción (-): no se observa cambio de color.

METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

UTILIZACIÓN DE GLUCOSA (OF-glucosa)

Fundamento: Los microorganismos degradan la glucosa fermentativa u oxidativamente. Los productos de la fermentación son una mezcla de ácidos relativamente fuertes que pueden ser detectados en una prueba convencional de fermentación. Sin embargo, los ácidos formados en la degradación oxidativa de la glucosa son extremadamente débiles y por consiguiente se requiere un medio más sensible para su detección, como es el medio **O/F glucosa** (peptona 2 g, glucosa 10 g, azul de bromotimol 0,03 g, NaCl 5 g, K_2PO_4H 0,3 g, agar 2,5 g, agua destilada 1000 ml, pH 6,8).

El medio O/F presenta las siguientes características:

- La concentración de peptonas es considerablemente más baja, 0,2%
- La concentración de hidratos de carbono es más alta, 1%
- La concentración de agar es del 0,2 al 0,3% dándole una consistencia semisólida

La menor proporción de peptona con respecto a la de carbohidratos reduce la formación de aminas alcalinas que podrían neutralizar las pequeñas cantidades de ácidos débiles que se forman como consecuencia del metabolismo oxidativo. La cantidad relativamente mayor de carbohidratos sirve para incrementar la cantidad de ácido que potencialmente se pueda formar, mientras que la consistencia semisólida del agar permite que los ácidos que se forman sobre la superficie del agar difundan a través del medio haciendo la interpretación del cambio de pH del indicador de más fácil visualización.

Procedimiento: A partir del caldo tripticasa soya con desarrollo bacteriano, sembrar en picadura en el medio de **OF-glucosa**, por duplicado. Agregar vaselina estéril líquida a uno de los tubos para favorecer la fermentación del azúcar. Incubar a 37º C durante 48 h.

Interpretación: La producción de ácido en el medio se detecta por el viraje del color verde inicial a amarillo intenso. El agregado de vaselina crea la anaerobiosis necesaria para la fermentación.

Los modelos de reacción que pueden aparecer son los siguientes:



Tubo sin vaselina: ácido (amarillo)

Tubo con vaselina: alcalino (verde)

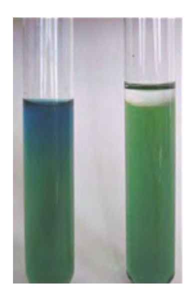
Metabolismo: oxidativo



Tubo sin vaselina: ácido (amarillo)

Tubo con vaselina: ácido (amarillo)

Metabolismo: fermentativo



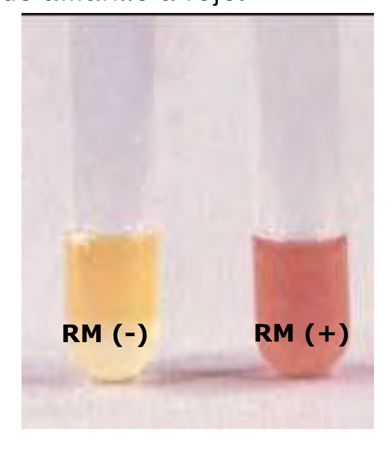
Tubo sin vaselina: alcalino (verde)

Tubo con vaselina: alcalino (verde)

Metabolismo: no sacarófilo

PRUEBA DEL ROJO DE METILO

Fundamento: La prueba del rojo de metilo detecta la producción de ácido (láctico, acético, fórmico, succínico) como consecuencia de la degradación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta. Dicha prueba se basa en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo, que presenta un rango de viraje entre 6 (amarillo) y 4,4 (rojo). Los microorganismos que realizan fermentación ácida mixta a partir de glucosa producen un descenso de pH por debajo de 4,5, lo que hace virar el indicador de pH rojo de metilo de amarillo a rojo.



El medio utilizado es CALDO GLUCOSA FOSFATO (caldo MR/VP o Clark y Lubs) que se utiliza también para la prueba de Voges-Proskawer. Su composición es la siguiente: peptona 5 g; glucosa 5 g; fosfato monobásico 5 g; agua destilada 1000 ml; pH ~ 7.

Procedimiento: Se inocula el medio con la cepa bacteriana y se incuba a 37º C durante 48 h. Luego del período de incubación se agregan 2 ó 3 gotas de rojo de metilo directamente al medio.

Interpretación: El desarrollo de un color rojo estable en el medio es indicativo de suficiente producción de ácido para mantener el pH a 4,4 o menos, y es una reacción (+), mientras que en la reacción (–) el color es amarillo-naranja.

PRUEBA DE VOGES-PROSKAWER

Fundamento: Esta prueba se basa en la detección de acetilmetilcarbinol (**acetoína**), un producto final neutro derivado del catabolismo de la glucosa llevado a cabo por determinadas bacterias.

El ácido pirúvico, el compuesto clave formado en la degradación de la glucosa, es metabolizado posteriormente por diversas vías dependiendo de los sistemas enzimáticos que posean las diferentes bacterias. Una de tales vías es la que produce como metabolito final, el 2,3-butanodiol (fermentación butilenglicólica). La acetoína es el precursor del 2,3-butanodiol:

La producción de 2,3-butanodiol causa un incremento de la producción de CO_2, originándose menos ácidos y acumulándose acetoína. El equilibrio entre acetoína y 2,3-butanodiol está determinado por la cantidad de H_2 disponible.

$$\text{2 Piruvato} \longrightarrow \text{Acetoína} + 2CO_2$$

$$\text{Acetoína} \xrightarrow{\text{Acetoína reductasa}} \text{2,3-butanodiol}$$

En presencia de O_2 y álcali, tanto la acetoína como el 2,3-butanodiol son oxidados a diacetilo, que es el compuesto que reacciona para dar el color en esta prueba. La secuencia de reacciones es la siguiente:

$$\text{glucosa} \xrightarrow{\text{fermentación}} \text{acetoína}$$

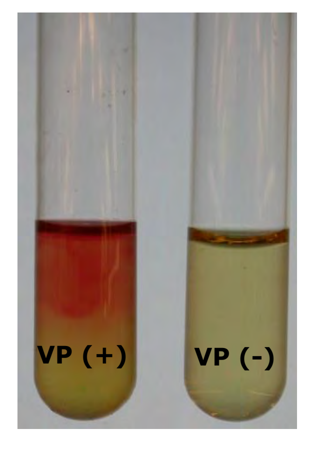
$$\text{Acetoína} + \alpha\text{-naftol} \xrightarrow[O_2]{\text{KOH 40\%}} \text{diacetilo}$$

$$\text{Diacetilo} + \text{Nucleo de guanidina presente en la peptona} \xrightarrow{\text{condensación}} \textbf{COLOR ROSA}$$

Procedimiento: Sembrar la cepa bacteriana en el CALDO GLUCOSA FOSFATO (caldo MR/VP o Clark y Lubs), incubar a 37º C durante 24 h. Luego del período de incubación se agregan 0.6 ml de reactivo α-naftol al 5% en etanol absoluto y 0.2 ml KOH al 40% en agua destilada. Agitar bien luego de agregar cada reactivo e inclinar el tubo para favorecer la aireación y dejar el tubo en reposo durante 10 – 15 minutos.

Interpretación: Reacción (+): color rosa después de los 15 min de la adición de los reactivos. La aparición de color se inicia en la parte superior del tubo y la lectura no debe hacerse después de 1 hora.

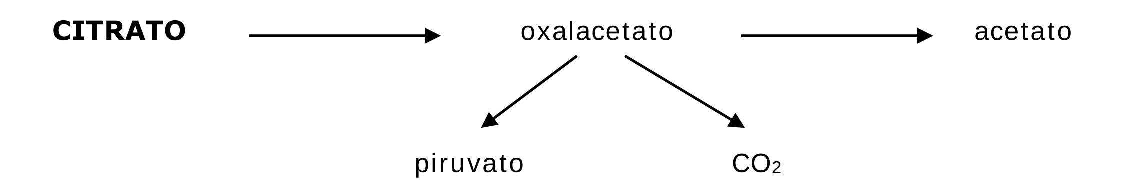
Reacción (–): sin cambios.



CITRATO DE SIMMONS

Fundamento: El citrato sódico es una sal del ácido cítrico, compuesto orgánico sencillo encontrado como uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs). Algunas bacterias pueden obtener energía utilizando el citrato como única fuente de carbono. En las bacterias, la degradación de citrato implica a un sistema enzimático sin la participación de la coenzima A, dicha enzima es la citrato oxalacetato-liasa, la cual requiere la presencia de un catión divalente para su actividad, generalmente Mg o Mn.

La degradación del citrato se produce de la siguiente forma:



Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependerán del pH del medio. A pH alcalino no hay producción de lactato y los productos son: **CO_2, ácido fórmico y ácido acético**. A pH ácido, **acetil metilcarbinol** y **lactato** son los productos principales que se forman en la degradación del citrato.

La utilización de citrato por una cepa bacteriana se detecta en medio con citrato, desprovisto de proteínas y de hidratos de carbono, por la producción de subproductos alcalinos. El medio incluye citrato sódico como única fuente de carbono y fosfato monoamónico como única fuente de nitrógeno.

Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden utilizar sales inorgánicas amónicas como fuente de nitrógeno, con la producción de iones amonio, que conduce a la alcalinización del medio por la conversión del NH_3^+ a hidróxido amónico. Se utiliza un indicadir de pH como el azul de bromotimol, que es amarillo a pH inferior a 6 y azul a un pH superior a 7.6.

Procedimiento: Inocular el medio Citrato (inclinado) con la cepa bacteriana, incubar a 37º C durante 24 – 48 h. Observar e interpretar los cambios producidos en el medio.

Interpretación:

Reacción (+): crecimiento bacteriano y viraje a azul en el pico.

Reacción (-): no se observa desarrollo y el medio permanece verde.



Cit (+) Cit (-)

PRUEBA DE TSI (Three Sugar Iron)

Fundamento: La composición de este medio de cultivo es la siguiente: Lactosa (1%), Sacarosa (1%), Glucosa (0,1%), tiosulfato sódico, sulfato ferroso, rojo de fenol (indicador de pH), peptona, extracto de levadura y extracto de carne, lo que lo hace un medio muy rico desde el punto de vista nutricional.

En el medio TSI se obtiene la siguiente información fisiológica:

– **Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa.** El medio contiene una pequeña cantidad de glucosa y una gran cantidad de lactosa y sacarosa. Los microorganismos capaces de fermentar cualquiera de estos compuestos darán lugar a la formación de ácidos que bajan el pH del medio, como consecuencia, el rojo fenol vira a amarillo.

La sucesión de eventos metabólicos es la siguiente:

1. El microorganismo utiliza la fuente de carbono más asequible en el medio, la **glucosa**. Pero como se encuentra en el medio en muy baja concentración se agota rápidamente. Los productos de su degradación acidifican el medio que cambia de rojo a amarillo.
2. Al agotarse la glucosa empieza a utilizar las **peptonas**, pero solamente en **aerobiosis** (se corresponde a la zona inclinada del tubo). Este consumo da lugar a residuos amoniacales, produciendo una alcalinización del medio. El indicador vira a rojo en esta parte del tubo.

3. Posteriormente se produce el consumo de **lactosa/sacarosa**, en el caso de los microorganismos que sean capaces de utilizar los disacáridos. Esto da lugar a un **descenso de pH** por lo que cambiará el medio de rojo a amarillo. La razón de que la lactosa y sacarosa se utilicen después es debido a que se trata de enzimas **inducibles**, lo que significa que existe un periodo de latencia entre el agotamiento de la glucosa y la producción de las primeras moléculas de ß-galactosidasa, de tal forma que después de un tiempo de consumo de peptonas se comienza a utilizar lactosa/sacarosa.

- **Producción de gas.** La producción de gas se detecta por la formación en el medio de burbujas de gas perfectamente visibles ya que rompen el medio. El gas se origina mediante la reacción catalizada por la **formiato liasa** a partir de ácido fórmico:

$$\text{H-COOH} \xrightarrow{\text{formiato liasa}} CO_2 + H_2$$

Por tanto, son **"gas (+)"** aquellos microorganismos que produzcan esta enzima.

- **Producción de SH_2.** Algunas bacterias son capaces de llevar a cabo la siguiente reacción a partir del tiosulfato añadido al medio:

$$2S_2O_3^{2-} + 4e- + 4\ H^+ \xrightarrow{\text{tiosulfato reductasa}} 2\ SO_3^{2+} + 2\ SH_2$$

El ácido sulfhídrico se detecta porque reacciona con las sales de metales pesados (Fe^{2+}) presentes en el medio. Esto da lugar a la formación de **sulfuro de hierro** que se deposita en gran parte del tubo, sobre todo en el fondo, oscureciendo el medio.

Procedimiento: Inocular la cepa bacteriana en un tubo de medio TSI (agar pico de flauta) con el ansa de siembra. La siembra se hará de la siguiente manera: sembrar **la superficie por estría** y sembrar **la parte interna del medio por picadura** (es necesario pinchar suficientemente, sobre todo para la detección de producción de sulfhídrico). Incubar 18 – 24 h a 37° C. Observar e interpretar los cambios producidos en el medio.

Interpretación:

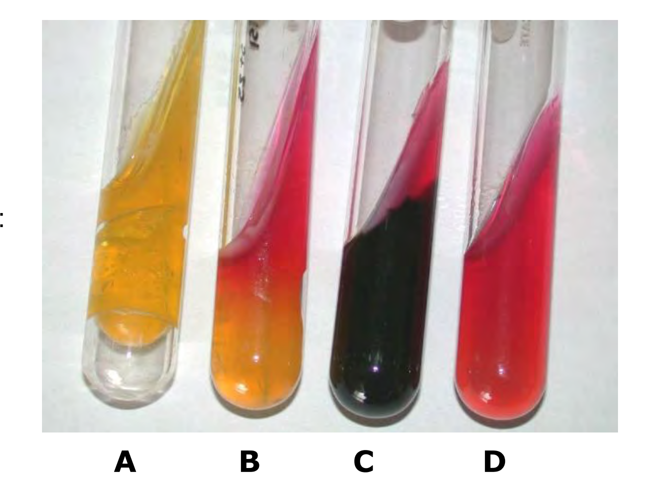
Parte inclinada y parte profunda amarilla: fermentación de los tres azúcares (A)

Agar fragmentado: producción de gas (CO_2 y H_2) (A)

Parte inclinada roja y parte profunda amarilla: fermentación de la glucosa (B) (C)

Precipitado negro: formación de sulfhídrico (C)

Parte inclinada roja y parte profunda "sin cambio": fermentación de glucosa (D)



A **B** **C** **D**

DETECCIÓN DE EXOENZIMAS

AMILASA



Fundamento: La hidrólisis del almidón es producida por enzimas llamadas amilasas. Al ser cubierta la placa con la solución iodada de lugol, si el almidón fue hidrolizado no hay formación del complejo almidón-iodo.

Procedimiento: Sembrar una estría del inóculo sobre Agar Almidón. Incubar 24 – 48 horas a 37º C. Al cabo del período de incubación, colocar el reactivo de lugol sobre la colonia bacteriana

Interpretación:

Reacción (+) Ausencia de color azul alrededor de la estría.

Reacción (–): Presencia de color azul oscuro alrededor de la estría.

DETECCIÓN DE PIGMENTOS

La producción de pigmentos está influenciada por la composición de los medios (tipos de peptonas y concentración de iones, sulfato, fosfato, magnesio, hierro). También influye la temperatura de incubación que debe ser menor a la óptima y se ve favorecida por la exposición del cultivo a la luz.

DETECCIÓN DE PIOCIANINA

Procedimiento: Sembrar el medio King A con la cepa bacteriana, incubar a 37º C durante 24 h. Luego del período de incubación, en el caso de la aparición de un pigmento verde azulado agregar 3 – 4 ml de cloroformo y leer el resultado entre 2 y 3 h.

Interpretación:

Resultado (+): coloración azul después de agregar cloroformo.

Se debe registrar el color del pigmento antes de agregar el cloroformo. La producción de piocianina se detecta por una coloración azul luego de agregar cloroformo.

DETECCIÓN DE PIOVERDINA

Procedimiento: Sembrar el medio King B con la cepa bacteriana, incubar a 37ºC durante 24 horas.

Interpretación:

Resultado (+): fluorescencia amarillo verdosa bajo la luz del día y verde brillante bajo la luz ultravioleta.

PRUEBAS DE CRECIMIENTO

Crecimiento 42º C

Procedimiento: Sembrar la cepa bacteriana en caldo nutritivo e incubar a 42º C durante 24 h. Luego del período de incubación observar la presencia o ausencia de desarrollo microbiano

Interpretación y Fundamento: Esta prueba junto con otras determinaciones puede utilizarse para diferenciar especies del género *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* desarrolla a 42º C, mientras que *Pseudomonas fluorescens* no desarrolla a dicha temperatura.

MÉTODOS BASADOS EN ENSAYOS SEROLÓGICOS

A los efectos de realizar identificaciones más rápidas, o cuando las pruebas bioquímicas no son concluyentes, se recurre al uso de reacciones antígeno-anticuerpos. El inmunodiagnóstico es utilizado frecuentemente en el laboratorio clínico para la detección de patógenos específicos y de sus productos. Son usados para confirmar los casos de crecimiento y también para identificar los agentes etiológicos cuando no es posible el crecimiento en los medios convencionales.

Los métodos serológicos, implican la utilización de preparaciones de inmunoglobulinas específicas provenientes del suero o de un reactivo, y que pueden ser de gran utilidad en la identificación microbiana en muestras puras o en muestras biológicas. Cada uno de los métodos tiene su fundamento particular, pero en líneas generales, todos se basan en la reacción de un antígeno presente en el agente microbiano con su anticuerpo correspondiente. La solución que contiene los anticuerpos se denomina antisuero.

Los métodos serológicos son muy útiles en diversas situaciones:

- Si a través de un sistema miniaturizado basado en pruebas bioquímicas se determinó que la bacteria causante de la infección es un miembro del género *Salmonella*, utilizando una batería de antisueros contra el antígeno O presente en el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas, es posible identificar a las cepas de *Salmonella* aisladas hasta el nivel de serotipo (poli O, A, B, C, D, etc.).
- La inmunofluorescencia ha resultado ser sumamente útil en casos de infecciones de diferente origen. Puede utilizarse para la identificación del microorganismo aislado o presente en una muestra biológica. En el método directo se fija la muestra problema a una lámina y se pone en contacto con el antisuero específico marcado con una sustancia fluorescente (rodamina o fluoresceína). Una vez transcurrido el tiempo para que tenga lugar la reacción antígeno anticuerpo, se expone la lámina a la radiación ultravioleta para visualizar la reacción. También existe la técnica indirecta, donde en primer lugar se utiliza el anticuerpo específico no marcado y posteriormente se utiliza un anti anticuerpo marcado.
- En caso de una infección viral, los virus no pueden ser identificados mediante pruebas bioquímicas, pero si pueden ser identificados en diferentes fluidos biológicos utilizando inmunoensayos, tales como el ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay), el cual, a manera general, utiliza anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno a identificar, marcados con una enzima.

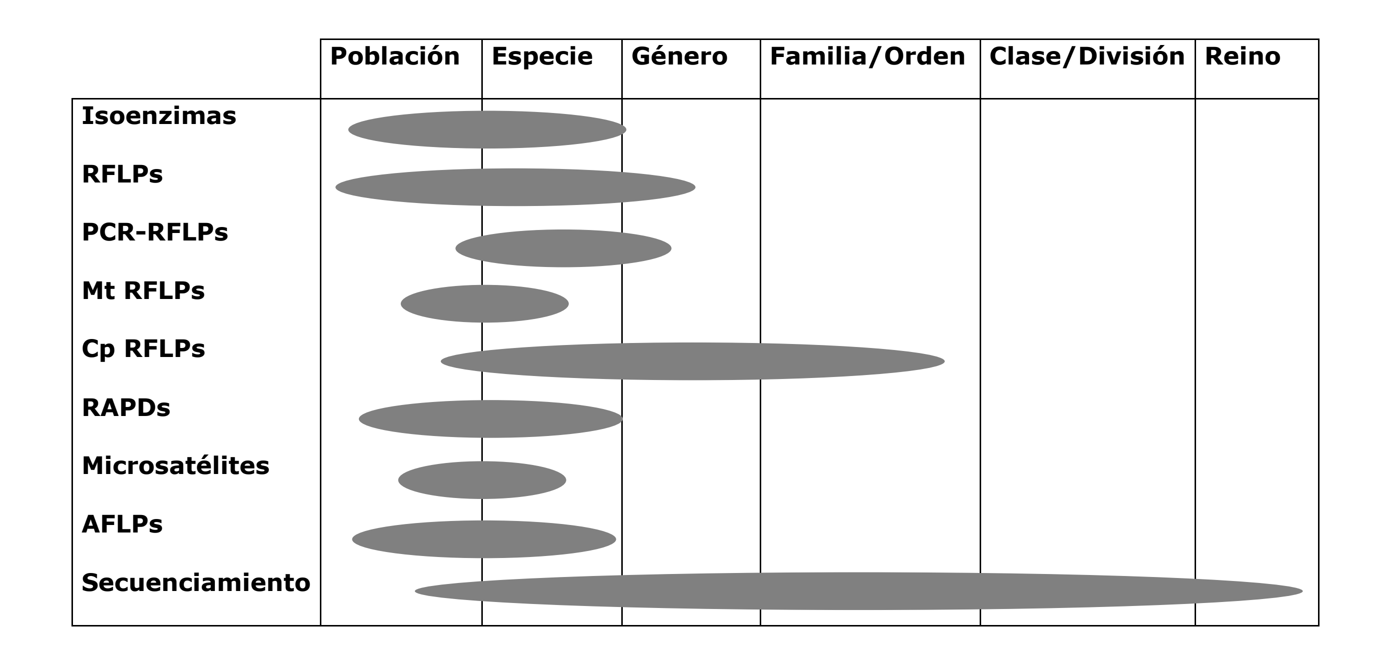
MÉTODOS BASADOS EN TIPIFICACIÓN CON FAGOS

La interacción entre un virus bacteriano (fago) y su célula bacteriana sensible es sumamente específica, ya que el proceso de adsorción se encuentra mediado por receptores específicos tanto en el virus como en la célula bacteriana. A una placa con medio de cultivo sólido inoculado con un cultivo puro de una determinada bacteria, se le añade una alícuota de un fago específico; éste puede ocasionar la lisis de las bacterias, hecho que se evidencia en el cultivo como zonas claras definidas, denominadas placas, que indican que hubo infección y lisis celular. El uso de fagos específicos permite identificar y subclasificar bacterias dentro de una misma especie.

MÉTODOS BASADOS EN CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS

La emergencia de la biología molecular ha dado lugar a nuevas herramientas moleculares que se han adaptado rápidamente al campo del diagnóstico microbiológico. Este nuevo enfoque utiliza factores genotípicos más que fenotípicos para identificar patógenos particulares.

De acuerdo a la técnica molecular utilizada podemos llegar a identificar un microorganismo en diferentes categorías:



Los métodos más comúnmente utilizados son los siguientes:

SONDAS DE ÁCIDO NUCLEICOS

Se fundamenta en complementariedad de bases de ácidos nucleicos. Se definen como secuencias de oligonucleotidos de ADN marcados, con un elemento radioactivo (^{32}P,^{125}I, ^{35}S, ^{3}H, ^{14}C) o con una proteína unida a una enzima como la fosfatasa alcalina. Estas sondas se utilizan para la detección de una secuencia complementaria de ADN o ARN, presente en el agente que se desea identificar.

La muestra, que se supone que contiene un agente microbiano con una secuencia complementaria que se desea identificar, se coloca en un filtro, se trata de manera tal de liberar al ácido nucleico, se calienta para que las cadenas complementarias se separen. Posteriormente se añade la sonda, y se deja transcurrir un periodo para que tenga lugar la hibridación si existe la cadena complementaria. La unión de la sonda a la secuencia complementaria se detecta mediante la señal radiactiva que emite la sonda o mediante métodos enzimáticos.

Dos cepas cuyos ADNs muestran por lo menos el 70% de similitud bajo condiciones óptimas de hibridización y, menos del 5% de diferencia en sus T_m, generalmente se consideran miembros de la misma especie.

A continuación se presentan una lista con ejemplos de microorganismos que han sido detectados e identificados por medio de sondas de ADN:

- **Bacterias Gram negativas**: *Neisseria gonorrhoeae, Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Haemophilus influenzae*.
- **Bacterias Gram positivas**: *Streptococcus* Grupo A, *Streptococcus* Grupo B, *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*.
- **Micobacterias**: *Mycobacterium tuberculosis, M. Avium, M. Intracelulare.*
- **Hongos**: *Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitis, Cryptococcus neoformans, Coccidiodes immitis*.

MARCADORES BASADOS EN LA TÉCNICA DE PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método poderoso con amplias aplicaciones en la biología molecular. Desde su desarrollo en 1985, la especificidad, sensibilidad y velocidad de ésta técnica ha permitido desarrollar muchos métodos para un amplio rango de áreas de investigación biológica y para toda clase de microorganismos. Dicha técnica tiene varias aplicaciones en microbiología, incluyendo genética y sistemática, ecología y microbiología de suelo, patología vegetal, microbiología médica, biotecnología y muchas otras.

Esta reacción enzimática permite la amplificación exponencial de fragmentos específicos de ADN mediante la síntesis de ADN *in vitro*. Para realizar una reacción de PCR es necesario contar con:

- ADN templado que contenga la región para ser amplificada,
- *Primers* de oligonucleótidos que flanqueen dicha región,
- ADN polimerasa termoestable aislada de *Thermus aquaticus,* llamada *Taq polimerasa*
- Nucleótidos trifosfatos (dNTPs).

Todos los componentes de la reacción se mezclan en un buffer apropiado que contiene iones Mg ($MgCl_2$) y el procedimiento consiste de una sucesión de 3 pasos los cuales están determinados por las condiciones de temperatura: **desnaturalización del templado** (90 – 95° C), **apareamiento de los primers** (50-60° C) y **extensión de la cadena de ADN** (72° C) (Figura 7.2).

Los productos de la amplificación son separados por electroforesis de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa o poliacrilamida si se requiere aumentar la resolución y, son visualizados por tinción con bromuro de etidio o plata, respectivamente.

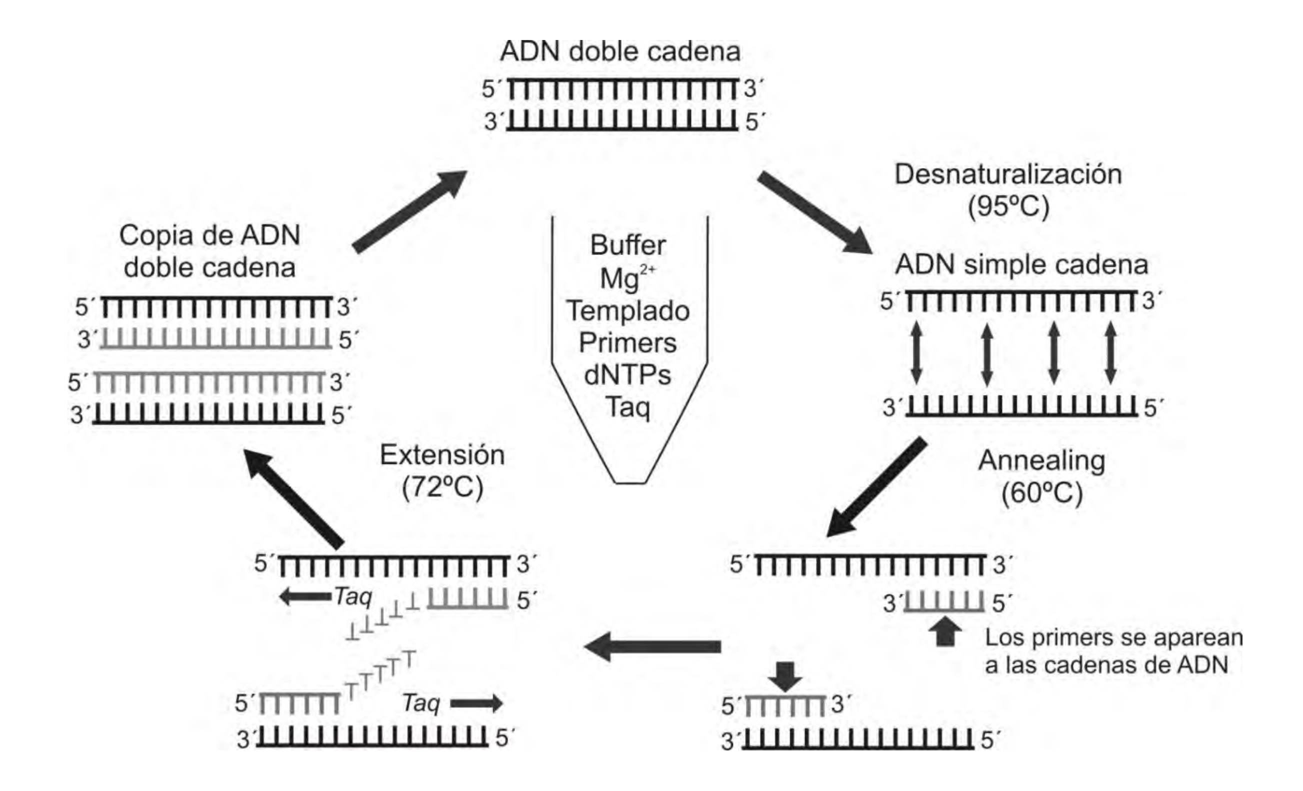


Figura 7.2. Esquema de la reacción de PCR.

Métodos basados en PCR

RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción).

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción se puede detectar analizando el ADN genómico digerido con endonucleasas de restricción por hibridización con sondas de ADN ("Southern blotting"). Las sondas usadas en el análisis de RFLPs se pueden generar a partir de ADN clonado, fragmentos de ADNc, ADN mitocondrial (ADNmt) o partir de segmentos específicos de ADN amplificados por PCR. De esta forma dependiendo de la sonda usada, dicha técnica se puede usar para analizar la variación del ADNmt, variación en la región del ADN ribosomal (ADNr) o variaciones en las secuencias repetidas o únicas.

RAPD (polimorfismo en el ADN amplificado al azar).

El análisis de RAPDs ha sido desarrollado para detectar polimorfismo entre organismos a pesar de la ausencia de información de la secuencia genómica, producir marcadores genéticos y construir mapas genéticos. El método se basa en la amplificación del ADN genómico por PCR usando *primers* cortos de secuencia arbitraria. Los ensayos RAPD-PCR han sido utilizados principalmente para definir variaciones intra y interespecíficas en las poblaciones microbianas.

AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados).

El análisis de AFLPs permite la diferenciación entre individuos, genotipos y cepas, identificación de especies con bandas conservadas, construir mapas genéticos, determinar diversidad genética en una población y además permite obtener un perfil complejo de marcadores. Los resultados son altamente reproducibles y es una técnica con resolución alta, rápida y eficiente.La técnica se basa en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción generados a partir de ADN genómico. El ADN es digerido con endonucleasas de restricción, generalmente una enzima de corte raro y otra de corte frecuente, tales como *Eco*RI y *Mse*I, respectivamente. Los adaptadores de oligonucleótidos son ligados a los extremos del ADN genómico en los sitios de restricción específicos. La amplificación de dichos fragmentos se lleva acabo usando *primers* que incluyan las secuencias de los adaptadores, parte de la secuencia del sitio de restricción y entre uno y cinco nucleótidos adicionales elegidos al azar. Uno de los *primers* se marca radioactivamente con [γ^{33}P]ATP, por lo tanto, serán visualizados sólo los fragmentos amplificados que llevan dicha marca. El uso de extensiones selectivas tiene la función de reducir el número de fragmentos amplificados. Dichos fragmentos son analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida.

SECUENCIACIÓN

Las estructuras genómicas pueden ser directamente comparadas a través del secuenciamiento del ADN y el ARN, y aunque existen técnicas que permiten un rápido análisis de ambas moléculas, el secuenciamiento del ARN es el más extensamente usado en la taxonomía microbiana.

Una de las moléculas que ha recibido mayor atención es el ARNr 16S de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos. Esta molécula es ideal para estudios de evolución microbiana y filogenia ya que es esencial para una organela crítica encontrada en todas las bacterias. Además, su estructura cambia muy lentamente con el tiempo presumiblemente debido a su rol constante y crítico. Debido a que el ARNr presenta regiones constantes y regiones variables, a través de su secuencia es posible analizar tanto microorganismos estrechamente relacionados como distantes desde el punto de vista filogenético.

Además del secuenciamiento de los ácidos nucleicos también es importante el análisis de secuencias de proteínas, ya que los cambios en las secuencias de ambas moléculas con el tiempo son considerados **cronómetros moleculares** y resultan de importancia en la determinación de relaciones filogenéticas y evolución.

Bibliografía

Brock TD, Smith DW, Madigan MT (2008). Microbiología 10º Ed. Editorial Prentice Hall, Hispanoamericana, México.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2014). Microbiología e Inmunología diagnósticas. En: ***Brock Biología de los microorganismos***. 12º Edición. Editorial Pearson Educación, S.A., pág. 1004 - 1039.

MacFaddin (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina.

Prats G. (2006). Técnicas genéticas. En: ***Microbiología clínica***. Editorial Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina, pág. 187-202.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2007). Métodos de clasificación e identificación de los microorganismos. En: ***Introducción a la Microbiología***. 9º Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina, pág. 292-304.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2002). Major Characteristics Used in Taxonomy. In: *Microbiology*. 5º Edición.

TEORICO PRÁCTICO 7.
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

El docente de la asignatura Microbiología le proporciona dos placas de agar nutritivo para que identifique los microorganismos que han desarrollado. En ambas se observan colonias aisladas, Ud. decide en primer lugar realizar una coloración de Gram y en uno de los preparados observa bacilos Gram negativos y en el otro, cocos Gram positivos. Ud. debe proponer la metodología adecuada para lograr la identificación a nivel de especie de ambas bacterias.

1) ¿Qué consideraciones debe tener en cuenta antes de iniciar una correcta identificación de dichas cepas? Mencione los métodos más comúnmente usados en la identificación bacteriana.

2) ¿Qué pasos seguiría teniendo en cuenta que puede hacerlo basado sólo en características fenotípicas? ¿Qué es una prueba primaria? Mencione las pruebas primarias que realizaría para ambos cultivos. Describa el fundamento de las mismas y qué información espera obtener al realizarlas.

3) ¿A qué se llaman pruebas secundarias y pruebas terciarias? Mencione las pruebas secundarias y/o terciarias que realizaría para ambos cultivos. Describa el fundamento de las mismas y qué información espera obtener al realizarlas.

4) ¿Podría usar sistemas comerciales para identificar ambos cultivos microbianos? Fundamente su respuesta proporcionando ventajas y desventajas de ellos.

5) Dado los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la taxonomía microbiana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S en bacterias y 18S en hongos es la herramienta más ampliamente utilizada. ¿Por qué el ARNr es elegido como blanco en varias técnicas moleculares? Fundamente su respuesta. Nombre y explique brevemente algunos de los métodos de identificación basados en características genéticas.

6) ¿Qué otros métodos moleculares, además del análisis de la secuencia génica del ARNr 16S, usaría para identificar ambos cultivos?

7) ¿Sería posible llevar a cabo una identificación de ambas cepas bacterianas por debajo del nivel de especie? Fundamente su respuesta.

LABORATORIO 6.
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

OBJETIVOS

- Conocer distintos métodos fenotípicos y genotípicos disponibles para la identificación microbiana.
- Usar pruebas metabólicas como herramientas microbiológicas para conocer el comportamiento fisiológico bacteriano.
- Conocer algunos métodos de identificación que se realizan por medio de sistemas comerciales.
- Identificar a nivel de especie una cepa fúngica a través del uso cebadores específicos mediante la técnica PCR.

DESARROLLO PRÁCTICO

Consigna del trabajo práctico: a las cepas de este práctico se les borraron los códigos de identificación por lo que no se conoce "cual es cual", su trabajo consiste en efectuar a los cultivos desconocidos de cepas puras que se les indique, las pruebas y ensayos necesarios para su identificación, de acuerdo a las características descriptas en la tabla anexa.

Primer día

Material por grupo de trabajo:

1) Dos cultivos desconocidos en sendos tubos con 2 ml de caldo de cultivo, crecidos durante toda la noche (12 a 18 hs).
2) Dos pipetas estériles
3) a- dos placas de agar nutritivo
   b- dos placas de agar almidón
4) Tres tubos de:
   a- medio de gelatina
   b- agar tioglicolato (mantenidos fluidos a 45 ºC)
   c- caldo glucosa-púrpura de bromocresol (con campanita Durham)
   d- caldo lactosa-púrpura de bromocresol (con campanita Durham)
   e- caldo triptona
   f- medio para movilidad

Actividades:

1- Registre el número de código (rótulo) de sus cultivos problemas
2- Marque una placa de Agar Nutritivo para cada problema y siembre el inóculo por agotamiento por estrías para obtener colonias aisladas.
3- Marque una placa de Agar-Almidón para cada problema y siembre una estría del desconocido en la parte central de su placa (una estría sola, no para aislar colonias).
4- Marque un tubo de cada medio para cada cultivo y mantenga un tubo de cada medio como control de esterilidad
   a- Usando una pipeta estéril para cada problema, siembre una gota de la suspensión bacteriana en sus tubos correspondientes para: tioglicolato, gelatina, caldo triptona y fermentación de azúcares. Al medio de tioglicolato homogeneícelo rápidamente rotando suavemente el tubo, antes de que se solidifique y luego enfríe con agua de la canilla. Los demás homogeneícelos por rotación suave (entre las palmas de las manos).
   b- Al tubo de medio movilidad inocule con un ansa recta (en aguja), tratando de efectuar un trazo recto entrando y saliendo por la misma línea de punción (no rasgar la columna de agar), debe practicar un movimiento rápido y con pulso firme.
5- Después de sembrar los materiales de 3- y 4- llévelos a incubar en estufa a 30 ºC por no más de 2 días.
6- Confeccione un preparado húmedo para cada problema, cubra con cubreobjetos y observe al microscopio para movilidad, registre su observación en la hoja de resultados.

7- Confeccione un preparado para coloración de Gram, seque y fije a la llama. Si queda tiempo coloree mediante la coloración de Gram, seque y observe al microscopio, anote sus observaciones en la hoja de resultados.

Segundo día

Materiales:

1- Los tubos y placas del primer día
2- Reactivos para las pruebas:
   a- Lugol (amilasa)
   b- Reactivo de Kovac (Indol)
   c- Agua oxigenada al 5% (catalasa)
   d- Batería de controles positivos y negativos (los aportará el instructor).
   e- Tabla de identificación.

Actividades:

1- Si no lo hizo el primer día observe la coloración de Gram y registre sus observaciones.
2- Realice la prueba de Indol, agregando al tubo de caldo triptona, varias gotas del reactivo de Kovac, no mezcle, un anillo rojo indicará que la prueba es positiva.
3- Coloque los tubos de gelatina en baño de hielo, déjelos durante 15 minutos, luego observe si solidifica o no. El positivo permanecerá líquido.
4- Observe al tubo de agar movilidad, el positivo dará turbio más halla de la línea de siembra, registre y compare con el resultado en fresco.
5- Observe los tubos de caldo glucosa y caldo lactosa para ver la formación de ácido y gas, registre sus resultados.
6- Observe los tubos de agar tioglicolato, para ver la zona de crecimiento en la columna, evalúe el comportamiento frente al oxígeno y registre los resultados
7- Revele las placas de agar-almidón con lugol.
8- Observe las placas de agar nutritivo para la morfología colonial, incluyendo: forma, tamaño, color y bordes.
9- Realice la prueba de catalasa en sus cultivos sobre agar nutritivo (directamente sobre la colonia o colocando el reactivo en un portaobjetos y depositando luego una colonia o más tomadas de la superficie del agar con un ansa nueva o vidriada (capilar estirado a la llama), en ambos casos observe la aparición de burbujas producto del desprendimiento de O_2.
10- Habiendo registrado todos los resultados compare sus microorganismos con los de la tabla y decida a que taxón pertenecen los mismos

OTRAS ACTIVIDADES

Observación de diferentes métodos de identificación por sistemas comerciales: En el trabajo práctico se evaluará su funcionamiento, las precauciones y consideraciones al momento de su uso, como así también las ventajas y limitaciones de dichos métodos.

Identificación a nivel de especie de una cepa fúngica a través del uso cebadores específicos por PCR: El protocolo correspondiente será entregado por el docente a cargo del trabajo práctico.

Observación de otros métodos genotípicos utilizados en la identificación de microorganismos.

TRATAMIENTO DE LOS MATERIALES USADOS:

- Una vez finalizado el trabajo de laboratorio, limpie adecuadamente las mesadas de trabajo con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Descarte todo material contaminado en las bolsas para residuos patógenos.
- Lávese las manos con jabón.

CAPÍTULO VIII.
PREGUNTAS TEÓRICAS

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CÉLULA BACTERIANA

1. ¿Cuántos tipos de células conoce? Realice un cuadro y grafique la célula procariótica y eucariótica donde figuren las principales diferencias entre ellas.
2. ¿Cuáles son los principales grupos de protistas eucarióticos? ¿Cuáles son los microorganismos que tienen como unidad estructural a la célula procariótica?
3. ¿Qué estructuras son vitales para la célula? ¿Cuáles son las envolturas o cubiertas que puede poseer la bacteria por fuera de su membrana celular?
4. Mencione la composición química y función de la membrana celular
5. ¿Cuáles son las diferencias significativas entre membrana celular de organismos procarióticos y eucarióticos?
6. ¿Qué características poseen las membranas de Archaea?
7. ¿Cómo están formadas las paredes de Eubacterias?
8. ¿Qué tipos de paredes celulares presentan las Archaea?
9. Mencione las diferencias estructurales y químicas de peptidoglicano de una bacteria Gram positiva y una Gram negativa
10. ¿Cómo explica el comportamiento de la pared frente a la tinción de Gram?
11. Describa el proceso de biosíntesis del peptidoglicano
12. ¿Qué funciones y/o propiedades se le atribuyen a la pared celular? ¿Qué acción tiene la lisozima y la penicilina? Defina protoplasto y esferoplasto.
13. ¿Cómo define a un flagelo y a una fimbria? Explique las diferencias en morfológicas y funcionales de cada uno.
14. ¿Qué disposición flagelar puede presentarse en la bacteria? ¿Qué utilidad práctica tiene?
15. Explique movimiento flagelar. ¿Qué energía utiliza para dicho movimiento?
16. ¿Qué estructuras son responsables de la flotabilidad de procariótes acuáticos? ¿Cómo están formadas?
17. ¿Qué materiales de reserva se pueden encontrar en el citoplasma como fuentes de carbono y energía? ¿Qué son los gránulos de volutina? ¿Cuándo se acumulan cada una de esas fuentes?
18. ¿Qué diferencias existe entre una célula vegetativa y una endospora? ¿En qué momento del ciclo ocurre la esporulación y a qué causa responde?

NUTRICIÓN MICROBIANA

1. Defina el término nutriente.
2. ¿Qué compuestos químicos son requeridos universalmente por todos los organismos vivos?
3. ¿Qué papel desempeña la membrana citoplásmica bacteriana desde el punto de vista nutricional?
4. ¿Cuáles son los diferentes mecanismos de entrada de nutrientes en la célula bacteriana? ¿Qué características presentan cada uno de ellos?
5. ¿Cuáles son las formas en que un nutriente que es fuente de carbono puede ser utilizado por los microorganismos? ¿Cómo se clasifica a los microorganismos según dichas fuentes?
6. ¿Bajo qué formas químicas puede incorporarse el nitrógeno, el azufre y el fósforo en las bacterias?
7. ¿Qué categorías nutricionales pueden establecerse entre los microorganismos de acuerdo a la naturaleza de la fuente de energía, fuente principal de carbono y fuente de poder reductor?
8. ¿Qué características debe presentar un compuesto para ser considerado factor de crecimiento? ¿Cuáles son y que funciones metabólicas cumplen?
9. ¿Cómo se clasifican los microorganismos de acuerdo al requerimiento o no de un determinado factor de crecimiento?

10. ¿Cómo clasifica a los microorganismos de acuerdo a los requerimientos de oxigeno molecular?
11. ¿Qué papel desempeñan las exoenzimas hidrolíticas en la nutrición bacteriana? ¿Qué tipo de bacterias la producen?

METABOLISMO MICROBIANO

1. Defina el término metabolismo.
2. Defina los términos anabolismo y catabolismo.
3. Los microorganismos obtienen energía por distintos tipos de procesos. ¿Cuáles son? Explique cada uno de ellos.
4. Defina respiración aeróbica y anaeróbica. Indique dador y aceptor de electrones y ganancia de ATP en cada caso.
5. Defina fermentación. Indique dador y aceptor de electrones y ganancia de ATP.
6. Mencione diferentes clases de fermentación realizadas por microorganismos. Indique los productos finales que las caracterizan. De ejemplos de microorganismos que las producen.
7. ¿Qué tipo de metabolismo energético emplean los microorganismo quimilitótrofos y quimiorganótrofos teniendo en cuenta además su comportamiento frente al oxigeno (anaeróbios, aeróbios, aeróbios facultativos, microarófilos)?
8. Indique el donador de electrones y el aceptor de electrones para cada uno de los siguientes casos:
    a) Oxidación de la glucosa en presencia de aire
    b) Reducción del nitrato en presencia de glucosa
    c) Oxidación de la glucosa en ausencia de aire
    d) oxidación del SH_2 en presencia de aire
9. ¿Cuál es el papel de la luz en el proceso fotosintético de las bacterias verdes y rojas? ¿Y en las cianobacterias?
10. Compare el proceso de fotosíntesis en estos dos grupos de procariotas.
11. ¿Dónde se localizan los pigmentos fotosintéticos en una bacteria roja, en una cianobacteria y en las algas verdes?
12. Describa la producción de ATP en un fototrófo anoxigénico?
13. ¿Cómo obtienen poder reductor las bacterias rojas y las cianobacterias?
14. En las bacterias oxidantes del H_2 ¿qué papel juegan la enzima hidrogenasa?
15. Defina el término mixótrofos.
16. Compare la utilización del SH_2 por una bacteria fotótrofa roja y una bacteria incolora del azufre como *Beggiatoa*. ¿Qué papel juega el SH_2 en el metabolismo de compuestos orgánicos?
17. ¿De qué modo obtiene energía *Thiobacillus ferrooxidans*? ¿Por qué el rendimiento energético de crecimiento es mayor cuando crece aeróbicamente con S elemental que sobre Fe ferroso? Caracterice el ambiente de estos microorganismos.
18. ¿Cuál es el donador inorgánico de electrones para *Nitrosomonas* y cuál para *Nitrobacter*?
19. ¿Cuáles son los sustratos de la enzima amoniaco mono oxigenasa (AMO) y de la amonio oxidasa (NO)?

CRECIMIENTO MICROBIANO

1. Defina el término crecimiento microbiano.
2. Nombre secuencialmente las fases de crecimiento de un cultivo microbiano. Explique cada una de ellas
3. ¿Qué diferencia existe entre velocidad de crecimiento y tiempo de generación?
4. Mencione diferentes métodos para medir crecimiento poblacional unicelular
5. ¿Qué métodos se utiliza para cuantificar masa celular?
6. ¿Cuál es el fundamento del método turbidimétrico?
7. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método de recuento en cámara?
8. ¿En qué consiste el método de recuento en placa? ¿Cómo se interpreta?

9. En qué consiste el método del número más probable (NPM)
10. Explique medio de cultivo continuo. ¿Qué es un quimiostato?
11. Defina crecimiento diauxico
12. Defina crecimiento sincrónico.

INFLUENCIA DEL AMBIENTE FÍSICO Y CAPACIDAD DE SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO EN CONDICIONES AMBIENTALES EXTREMAS

1. ¿Cuál es el rango de temperaturas en el que es posible el desarrollo bacteriano?
2. ¿Qué temperaturas cardinales poseen los microorganismos psicrófilos, mesófilos, termófilos?
3. ¿Cómo es la representación gráfica, velocidad de crecimiento vs temperatura para los grupos antes mencionados? ¿Qué fundamentación bioquímica podría realizar?
4. ¿Qué adaptaciones fisiológicas poseen los microorganismos que crecen a altas y bajas temperaturas?
5. ¿Cómo se clasifican los microorganismos con respecto a pH?
6. ¿Cómo es la representación gráfica, velocidad de crecimiento vs pH?
7. ¿Qué efectos provoca en las células microbianas el agregado de ácidos y bases débiles y fuertes?
8. ¿Cómo se define la actividad acuosa?
9. ¿Cómo se denominan los grupos fisiológicos capaces de crecer a diferentes actividades acuosas?
10. ¿De qué mecanismos se valen los microorganismos que crecen a baja actividad acuosa para equilibrar su presión osmótica interna?
11. ¿Cuáles son las radiaciones que tienen importancia en la vida microbiana?
12. ¿Qué efectos provoca la radiación gamma en un sustrato hidratado?
13. ¿Qué factores influyen sobre la sensibilidad a la radiación?
14. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas en la utilización de radiaciones ionizantes?
15. ¿Cuál es la longitud de onda ultravioleta más eficaz para la destrucción de microorganismos?
16. ¿En qué casos se utiliza la luz UV como germicida?

INFLUENCIA DEL AMBIENTE QUÍMICO

1. Defina agente antimicrobiano
2. ¿Qué diferencias existen entre un agente cida y estático? Para qué se cumpla esta distinción, ¿qué requisitos deben observarse?
3. Mencione las diferencias entre un desinfectante, antiséptico y quimioterápico
4. ¿Cuáles son los principales agentes químicos que se usan para inhibir o destruir microorganismos y que mecanismos de acción poseen?
5. Defina antibiótico. ¿A qué niveles pueden actuar los antibióticos? ¿Cómo pueden ser clasificados los antibióticos?
6. ¿Qué significa que un antibiótico sea de amplio espectro o de espectro reducido?
7. Mencione agentes antimicrobianos quimioterapéuticos que actúen sobre la síntesis de pared celular. Mencione mecanismo propuesto
8. Mencione agentes antimicrobianos quimioterapéuticos que actúen sobre la membrana celular. Mencione mecanismos propuestos.
9. Mencione agentes antimicrobianos quimioterapéuticos que actúen sobre la síntesis de proteína. Mencione mecanismo propuesto.
10. Mencione agentes antimicrobianos quimioterapéuticos que actúen sobre el DNA. Mencione mecanismo propuesto.
11. Defina toxicidad selectiva. De acuerdo a los distintos mecanismos de acción de los antibióticos indique cual es el que posee mayor y menor toxicidad selectiva.
12. ¿Qué agente antimicrobiano de origen sintético conoce? ¿Cuáles son sus mecanismos de acción?

13. ¿Cómo determina prácticamente la actividad de un agente antimicrobiano? Defina antibiograma, CIM y CBM

REPRODUCCIÓN VIRAL

1. ¿Qué son los virus? ¿Cómo están constituidos? ¿Qué tamaño poseen?
2. ¿Qué diferencia existen entre bacterias y virus?
3. ¿A qué huéspedes parasitan los virus?
4. ¿Qué tipo de simetría presentan?
5. ¿Qué composición química presentan los virus?
6. ¿Cómo actúan los diferentes agentes físicos y químicos (temperatura, radiaciones, desinfectantes, antisépticos, antibióticos) sobre los virus?
7. ¿Cómo se cultivan los virus? ¿Cómo puede detectarse la presencia de los mismos?
8. Describa el mecanismo de replicación de los virus. Explique brevemente las diferentes fases
9. ¿Qué son los bacteriófagos?
10. Cuáles son los puntos de adsorción de los fagos?
11. Explique el ciclo lítico, detallando sus fases.
12. Como puede observarse prácticamente este fenómeno?
13. Explique el ciclo lisogénico ¿Qué diferencias presenta con el ciclo lítico?
14. Que propiedades pueden presentar las bacterias lisogenizadas?
15. ¿Qué es la fagotipia?

GENÉTICA MICROBIANA

1. Cite las dos formas en que se producen los cambios en la información genética de una célula.
2. ¿Cómo está constituido el genoma de los eucariotas? ¿Y el de los procariotas?
3. Describa las características y funciones de los plásmidos.
4. ¿Qué son los factores R? ¿Por qué son importantes desde el punto de vista clínico?
5. ¿Que son los plásmidos conjugativos?
6. Defina genotipo y fenotipo.
7. Explique estos tipos de mutaciones: sustitución de una base, delección, inversión, transposición, duplicación.
8. ¿Que son las mutaciones espontaneas?
9. ¿Que son las mutaciones inducidas? ¿Qué es un agente mutagénico?
10. De un ejemplo de un agente mutagénico químico. ¿Cómo actúa la luz UV como agente mutagénico?
11. ¿Por qué los agentes mutagénicos biológicos se denominan elementos transponibles o genes saltarines? ¿Qué son los transposones y como benefician a la célula? ¿Que son las secuencias de inserción y cómo funcionan?
12. ¿Qué dos factores determinan como afectara una mutación al fenotipo de una célula?
13. ¿Qué es una mutación silenciosa? ¿Y una mutación sin sentido?
14. ¿Qué es una mutación letal? ¿Y una auxótrofa?
15. ¿Que son las mutaciones condicionales? De un ejemplo.
16. Nombre las tres formas en que se produce intercambio genético en las bacterias. Compare y contraste el intercambio genético en los procariotas y en los eucariotas.
17. ¿Qué es la transformación? Describa la transformación natural y la transformación artificial.
18. Describa la conjugación de *Escherichia coli*. ¿Qué es una célula Hfr y una Célula F+?
19. ¿Que son los bacteriófagos (fagos)? Describa la transducción generalizada y la transducción especializada. Utilice en las explicaciones los términos ciclo lítico y ciclo lisogénico.

RESPUESTA DE LOS MICROORGANISMOS AL AMBIENTE BIÓTICO Y ABIÓTICO

1. Describa los diferentes tipos de relaciones que se pueden establecer entre microorganismos y entre microorganismos y organismos superiores. De ejemplos
2. ¿Qué entiende por flora normal de un individuo sano? De ejemplos de diferentes ubicaciones de dicha asociación.
3. ¿Qué entiende por colonización?
4. ¿Qué diferencias hay entre infección inaparente y enfermedad infecciosa?
5. Defina los términos patogenicidad y virulencia. Indique cómo puede medirse esta última.
6. Mencione los factores determinante de la acción patógena
7. ¿En qué consiste el fenómeno de adherencia?
8. ¿Cómo definiría a las agresinas e impedinas? De ejemplos y nombre microorganismo productoras de ellas.
9. Describa las diferentes formas de penetración bacteriana y la modalidad de infección en cada caso
10. ¿Cuáles son los factores que determinan la multiplicación bacteriana en determinados tejidos?
11. Nombre los mecanismos de defensa inespecíficos de tipo humoral y celular en el hospedador?
12. Qué factores bacterianos actúan interfiriendo en los mecanismos de defensa antes mencionado
13. ¿Qué características diferenciales existen entre las endotoxinas y exotoxinas? De ejemplos de cada una de ellas, mencionando el microorganismo productor
14. ¿Cuáles son los diferentes mecanismos de acción propuestos por las exotoxinas?
15. Describa para cada una de las siguientes exotoxinas, el microorganismo productor, el mecanismo de acción y como su acción puede ser neutralizada
    a: Toxina diftérica
    b: Toxina tetánica
    c: Toxina botulínica
    d Toxina colérica

e-book



Manual de microbiología general

María Reynoso, Carina Magnoli, Germán Barros y Mirta Demo

El presente Manual está dividido en ocho capítulos, con 7 teóricos prácticos, 6 prácticas de laboratorios y una guía de preguntas teóricas, diseñados para que el estudiante se familiarice gradualmente con los contenidos de la asignatura Microbiología I, que forma parte del plan de estudio de la carrera Microbiología impartida en la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El objetivo general de la asignatura Microbiología I es que el estudiante se inicie en el conocimiento de la biología básica de los microorganismos (beneficiosas y perjudiciales), en sus características morfológicas, fisiológicas, nutricionales y genéticas, proporcionando un panorama global de la importancia de los mismos en la vida del hombre y en las modificaciones que ocurren en la naturaleza en base a sus actividades como saprófitos, parásitos o simbiontes. Asimismo, se pretende que el estudiante adquiera las habilidades necesarias para su manipulación en el laboratorio.

Colección PASATEXTOS

UniRío editora



ISBN 978-987-688-124-1